



FACULTAD DE CIENCIAS

Programa de Doctorado en Física de
la Materia Condensada, Nanociencia
y Biofísica

NUEVOS ANTIBACTERIANOS BASADOS EN ENZIMAS LÍTICAS DE LA PARED CELULAR DE *Streptococcus mitis* Y *Streptococcus pneumoniae*

MEMORIA
presentada por

Cristina Gallego Páramo

para optar al Grado de Doctor por la UAM

Directora: Dra. Margarita Menéndez

Departamento de Química-Física Biológica
Instituto de Química Física Rocasolano

**CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**



NUEVOS ANTIBACTERIANOS
BASADOS EN ENZIMAS LÍTICAS

de la pared celular de *Streptococcus mitis* y
Streptococcus pneumoniae

Cristina Gallego Páramo

TESIS DOCTORAL

La presente Tesis ha sido realizada en el
Departamento de Química-Física Biológica
del Instituto de Química Física Rocasolano
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC), bajo la dirección de la Dra. Margarita Menéndez.

Ha sido financiada mediante la concesión de una beca FPI
del Ministerio de Ciencia e Innovación, y de una estancia
breve asociada, así como por el CIBER de Enfermedades
Respiratorias (CIBERES) Insto. de Salud Carlos III.

*A Miguel y Esther,
mis padres*

AGRADECIMIENTOS

En un principio, y reconozco que más por vergüenza que por otra cosa –pues ya sabemos que los agradecimientos suelen atraer especialmente la atención de lectores no necesariamente interesados en el resto del contenido de una tesis–, mis agradecimientos iban a limitarse a las aportaciones más directas al material científico aquí recogido. Pero cuando se hace el ejercicio de sentarse a recapitular para plasmarlos por escrito una se da cuenta de la cantidad de hechos, situaciones y personas que han contribuido a que esté donde estoy ahora y, además, con una tesis terminada entre mis manos. Por eso al final estos agradecimientos se han convertido también en una expresión de mi reconocimiento y gratitud, y en la historia del cómo y el porqué de esta tesis.

Una tesis doctoral se apoya en el trabajo de muchas personas: en el de aquellas que te enseñan, que participan directamente en el desarrollo de los experimentos o que te ayudan a que los lleves a cabo. Pero también en el trabajo de las que, antes de nuestra llegada, han investigado, ensayado y puesto a punto ideas y metodologías que nos han permitido partir de una posición aventajada y avanzar más rápido en nuestro trabajo. Como dijo Sir Isaac Newton, “si he logrado ver más lejos es porque he subido a hombros de gigantes”. Es por ello que el principal agradecimiento de esta tesis sea para mi directora, la Dra. Margarita Menéndez. Considero muy importante haber tenido una directora a la que admirar, que es un gran ejemplo a seguir en cuanto a conocimientos y rigor científicos y de la que he intentado aprender todo cuanto me ha sido posible. Es un orgullo para mí haber podido formar parte de su grupo de investigación.

Margarita me confió el estudio de Skl, enzima con la que me inicié en el aprendizaje de las técnicas de caracterización químico-física y el uso de programas de modelado de estructuras 3D, gracias a la cual pude presentar mis primeras contribuciones a congresos y que conforma la primera parte de los resultados de esta tesis.

En la parte de caracterización estructural de Skl mis agradecimientos son también para el Dr. Fernando Díaz, del Centro de Investigaciones Biológicas, y al Dr. Rubén Martínez-Buey, de la Universidad de Salamanca, por sus explicaciones y ayuda en los experimentos y el procesamiento de datos de SAXS y porque hicieron más divertidas las estancias en el sincrotrón de Grenoble.

Gracias a la estancia en el Imperial College de Londres, con el grupo de Bioinformática Estructural del Prof. Michael J. E. Sternberg, pude aprender algo más sobre programas y modelado de proteínas, lo que me permitió mejorar el modelo a alta resolución de Skl, y fue además una excelente forma de practicar el inglés, entablar amistades con personas de muchas nacionalidades y que me han aportado mucho (Ben y Xing, entre otras muchas) y abrir la mente, cualidades muy necesarias en ciencia.

Durante el estudio de Skl leí también sobre las demás enzimas capaces de romper la pared celular de neumococo. Y, aparentemente, en cuanto a utilidad práctica –emplearla como enzibiótico–, parecía que Skl no iba a darnos muchas sorpresas; no era tan buena degradando las paredes bacterianas como por ejemplo LytA. En ciencia es importante la búsqueda de respuestas, pero igualmente –o tal vez más– lo es la formulación de preguntas, puesto que orientan nuestro pensamiento y atención hacia una dirección en concreto. Y en este punto la pregunta fue: ¿qué hacía que Skl tuviera ese comportamiento? Esto nos llevó a plantear la construcción de las enzimas quiméricas, cuya caracterización y estudio funcional se recoge en la segunda parte de los resultados, y que fue lo que terminó definiendo por completo el rumbo y la historia que se cuenta en la tesis.

El desarrollo de la parte más biológica de los resultados ha sido posible gracias a la colaboración con el Dr. Pedro García y su grupo, del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC. Bajo su supervisión y con la ayuda de María y Roberto llevé a cabo la construcción de los genes de las enzimas quiméricas y aprendí sobre la preparación de los cultivos y la metodología de los ensayos de actividad sobre neumococo. Esther también contribuyó a los ensayos de actividad sobre paredes radiactivas. Del Dr. Ernesto García y su grupo, en el mismo centro, he recibido también excelentes consejos y ayuda.

Esta tesis también ha sido posible gracias a todos mis compañeros de grupo desde los inicios de la tesis: Noemí, Laura, Marta, Palma, Lupe, Manu y las más recientes Noelia y Celia; también a nuestra técnico Vicky. De todos ellos he podido aprender muchas cosas, me han ayudado, explicado y escuchado. Agradezco especialmente la aportación de Lupe a esta tesis con su labor en la purificación y caracterización de los mutantes de Skl, la proteína con la que comencé esta aventura, y la de Vicky con su apoyo técnico, sobre todo su cuidado en la preparación de los experimentos de ultracentrifugación analítica.

Me gustaría, además, destacar algo que normalmente suele pasarse por alto y es, aparte de la indudable calidad científica de la Dra. Margarita y el grupo, su calidad humana. Me considero afortunada por haber trabajado con buenas personas en un ambiente de confianza y compañerismo y haber recibido su apoyo y comprensión en momentos difíciles.

Mi gratitud se extiende a los numerosos compañeros y personal del Instituto de Química-Física Rocasolano y de los demás centros con los que he tenido la suerte de compartir momentos. La Dra. Dolores Solís y las chicas de su grupo Eliza, Lara, M^a Asun, Ioanna, Begoña. Mis compañeros de pasillo Bea, Sheima, Maru, Silvia, Lara, Javi, Rosa, Laura y Mon, y los que se nos unían a la hora de la comida, Soraya, Miguel Mompean, Miguel Garavís, Fer, Santi, Diana, Yasmina y Miguel... No os podéis hacer una idea de lo que me alegraba el día poder comer con vosotros y escuchar y compartir historias, fueran científicas o no, en un ambiente tan enriquecedor. Y lo mismo con personas como Susana, en el CIB. También tengo que mencionar al grupo de “Proteinómanas” que se formó en los cursos de doctorado: Susana, Miren, Esther, Cristina, María y Laura, y que, junto con Jose, en mi opinión reunió a mentes brillantes, a las que admiro y que me sirven de inspiración. Gracias también a todos los compañeros que me han hecho partícipe de momentos especiales de sus vidas fuera del ámbito de trabajo, me ha encantado que quisierais compartir conmigo vuestras alegrías y poder disfrutarlas juntos.

El mayor agradecimiento lo reservo para mi familia. Mi hermana Berta, con la que comparto vocación, de la que me enorgullezco, y una de las personas con quien más disfruto debatiendo, hablando de ideas, de sueños y aspiraciones; me temo que me conoce mejor que yo misma. Y Miguel y Esther, mis padres, protagonistas de la dedicatoria de esta tesis y sin los que nada de esto hubiera sido posible. Desde que en preescolar leí que veníamos de una célula –conocimiento que me supuso una revolución y que me llevó a hacer a mi padre muchas más preguntas... – no he dejado de leer, de preguntar, de observar, de disfrutar con cada detalle que iba descubriendo, siempre queriendo ir más allá. Y vosotros me habéis alentado y ayudado para que pudiera seguir el camino que mi curiosidad me iba marcando. Si he llegado a escribir esta tesis es gracias a vosotros. Sobre todo porque también habéis estado ahí en los peores momentos. Mamá, gracias por cuidarnos, por tus sacrificios, tu diligencia

y ayuda, porque consigues que las cosas siempre estén a punto y perfectas sin que nos dé tiempo a pedirte las. Muchas veces no sé de dónde sacas fuerzas. También porque desde pequeña siempre me dijiste que yo iba a ser una doctora (tal vez no en lo que imaginabas, pero espero que te sientas igualmente orgullosa). Y papá, gracias también por tus sacrificios, por tu ayuda en todo, por tu guía y consejos. Gracias por todo lo que me has enseñado, porque conseguiste hacer mía también tu curiosidad por aprender. Por tu paciencia cuando me explicabas cosas de matemáticas que no entendía y que me hacían enfadar, hasta que mi camino empezó a especializarse en temas en los que ya no me podías echar una mano, y yo te decía “ya verás toda la historia cuando presente la tesis”. Y ese momento ha llegado y tú no estás ya para verlo... Ese es un dolor que me acompañará toda mi vida. Solo espero que a pesar de no haber visto el final de este trabajo pudieras sentirte orgulloso de mí. Nosotras lo estamos de ti, de tu inteligencia, tu tesón, tu sensibilidad, tu bondad, tus valores y tu saber estar. Estarás con nosotras para siempre como ejemplo y en todo lo que nos has transmitido.

He recorrido un largo camino hasta que finalmente esta tesis ha tomado forma material; en ese tiempo han pasado muchas cosas y he aprendido muchísimo, tanto de la ciencia como de la vida. He llegado a sentir el final de esta tesis como una culminación, pero realmente hay que entender que es tan solo un paso en la apasionante carrera por aprender, por saber, por desvelar los misterios de lo que nos rodea. Aprender es una de las cosas que más me gusta en esta vida y que, me lleve donde me lleve, no pienso dejar de hacer nunca.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABLAS	xxi
ABREVIATURAS	xxiii
RESUMEN-ABSTRACT	xxvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El género <i>Streptococcus</i>	4
1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> (neumococo)	5
1.2.1. Aspectos históricos	5
1.2.2. Características generales	6
1.2.3. Importancia clínica, epidemiología y virulencia	7
1.2.4. Prevención y tratamiento de la enfermedad neumocócica	10
1.2.4.a. Vacunas	10
1.2.4.b. Antibióticos	12
1.3. <i>Streptococcus mitis</i>	14
1.3.1. Características generales	14
1.3.2. Importancia clínica	15
1.4. Los bacteriófagos	16
1.5. La pared celular bacteriana	20
1.5.1. El peptidoglicano	21
1.5.2. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos	22
1.6. Peptidoglican-hidrolasas codificadas por <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> y sus bacteriófagos	26
1.6.1. Estructura de las CBPs	30
1.6.2. Skl, una amidasa dependiente de colina codificada por el profago ΦSK137 de <i>S. mitis</i>	35
1.7. Aplicaciones biomédicas de fagos y PG hidrolasas líticas: terapia fágica y enzibióticos	37
1.7.1. Lisinas de diseño	39
2. OBJETIVOS	43

3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Materiales	51
3.1.1. Estirpes bacterianas y medios de cultivo	51
3.1.2. Plásmidos y oligonucleótidos	54
3.1.3. Reactivos químicos y herramientas informáticas	56
3.2. Métodos	56
3.2.1. Crecimiento y conservación de cepas bacterianas	56
3.2.2. Transformación genética	56
3.2.2.a. Transformación por choque térmico	56
3.2.2.b. Transformación por electroporación	57
3.2.3. Técnicas de DNA	57
3.2.3.a. Extracción y purificación de DNA	57
3.2.3.b. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	58
3.2.3.c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
3.2.3.d. Secuenciación de DNA	58
3.2.3.e. Manipulación del DNA con enzimas de uso común en Biología Molecular	58
3.2.4. Construcción y clonación de genes en cepas hiperproductoras	59
3.2.4.a. Construcción de genes quiméricos	59
3.2.4.b. Construcción de mutantes de SkI	64
3.2.5. Técnicas de Proteínas	64
3.2.5.a. Expresión, purificación y cuantificación de proteínas	64
3.2.5.b. Electroforesis en geles de poliacrilamida	65
3.2.5.c. Espectrometría de masas	65
3.2.5.d. Dicroísmo circular	66
3.2.5.d1. Recogida de espectros	68
3.2.5.d2. Curvas de valoración con colina	68
3.2.5.d3. Barridos de temperatura	69
3.2.5.e. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	70
3.2.5.f. Ultracentrifugación analítica	72
3.2.5.f1. Equilibrio de sedimentación	72
3.2.5.f2. Velocidad de sedimentación	73
3.2.5.g. SAXS	75
3.2.5.g1. Recogida de espectros	77
3.2.5.g2. Procesado y análisis de datos	77

3.2.5.g3. Construcción de modelos 3D ab initio y orientación relativa de los módulos por modelado de cuerpo rígido	78
3.2.5.h. Modelado por homología de los módulos de Skl	79
3.2.5.h1. Búsqueda de patrones estructurales y alineamiento de secuencias	79
3.2.5.h2. Construcción y validación de los modelos	80
3.2.6. Ensayos de actividad enzimática	80
3.2.6.a. Actividad enzimática in vitro sobre paredes purificadas	80
3.2.6.b. Actividad bacteriolítica y bactericida	81
3.2.6.c. Determinación de la CMI	82
3.2.7. Modelo animal de infección en embriones de peces cebra	83
4. RESULTADOS	87
4.1. La endolisina Skl	89
4.1.1. Reconocimiento de colina. Influencia en la estructura de Skl	89
4.1.1.a. Caracterización espectroscópica de la valoración de Skl con colina	90
4.1.1.b. Estructura cuaternaria de Skl. Dependencia de la unión a colina.	93
4.1.2. Estabilidad térmica y organización modular de Skl. Influencia del pH y la unión de colina	97
4.1.2.a. Análisis espectroscópico: DC	97
4.1.2.b. Calorimetría diferencial de barrido	100
4.1.3. Caracterización de la estructura 3D de Skl	103
4.1.3.a. Modelado por homología del módulo catalítico. Residuos implicados en la catálisis	103
4.1.3.a1. Construcción, aislamiento y caracterización de mutantes del centro activo	107
4.1.3.b. Modelado por homología del módulo de unión a colina. Superficie de dimerización	111
4.1.3.b1. Reconocimiento de colina	114
4.1.3.b2. Interfaz de dimerización	115
4.1.4. Caracterización de la organización modular de Skl por SAXS	118
4.1.5. Actividad lítica de Skl	126

4.2. Enzimas Quiméricas	131
4.2.1. Construcción de enzimas líticas quiméricas entre las amidasas LytA y Skl	133
4.2.2. Caracterización estructural de las quimeras	134
4.2.2.a. Caracterización espectroscópica de la estructura secundaria y terciaria, y de la interacción con colina	134
4.2.2.b. Estructura cuaternaria de QLAS1 y QSLA2. Influencia de la unión de colina	138
4.2.2.c. Estabilidad térmica y organización modular de las quimeras. Influencia de la unión de colina	140
4.2.2.c1. Análisis espectroscópico: DC	140
4.2.2.c2. Calorimetría diferencial de barrido	142
4.2.3. Actividad lítica de las quimeras	146
4.2.3.a. Degradación de paredes celulares	146
4.2.3.b. Ensayos sobre bacterias	146
4.2.3.c. Determinación de CMLs	154
4.2.3.d. Actividad “ <i>in vivo</i> ” sobre peces cebras	155
5. DISCUSIÓN	159
5.1. Estructura tridimensional de Skl	163
5.1.1. Módulo catalítico	163
5.1.1.a. Centro activo y mecanismo catalítico	166
5.1.2. CBM	170
5.1.2.a. Reconocimiento de colina	170
5.1.3. Organización modular	172
5.1.3.a. Monómero	172
5.1.3.b. Dímero	175
5.2. Relaciones estructura-función: actividad lítica en paredes y bacterias	178
6. CONCLUSIONES	183
7. BIBLIOGRAFÍA	189
8. ANEXO	229

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> y su cápsula polisacáridica	9
Figura 1.2	<i>Streptococcus mitis</i>	15
Figura 1.3	Ciclos de vida de un bacteriófago	18
Figura 1.4	Bacteriófagos de <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. mitis</i>	19
Figura 1.5	Esquema de la organización de los componentes de la membrana y la pared celular en bacterias Gram-positivas	21
Figura 1.6	Representación esquemática de los componentes del peptidoglicano de <i>S. pneumoniae</i>	23
Figura 1.7	Estructura de los LTAs de <i>S. pneumoniae</i>	24
Figura 1.8	Unidad repetitiva del WTA específico de <i>Streptococcus mitis</i>	25
Figura 1.9	PG hidrolasas de <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> y sus bacteriófagos	28
Figura 1.10	Tipos de sitios de unión a colina	31
Figura 1.11	Estructuras 3D de CBPs con actividad hidrolasa	33
Figura 1.12	Estructuras 3D de dominios CHAP	36
Figura 3.1	Esquema de la estrategia utilizada para la construcción de las quimeras QLAS1 (A) y QSLA2 (B)	60
Figura 3.2	Esquema ilustrativo de la generación de un espectro de dicroísmo circular	67
Figura 3.3	Curva de capacidad calorífica en función de la temperatura	71
Figura 3.4	Representación esquemática de un experimento de SAXS	75
Figura 3.5	Esquema de un ensayo de actividad bacteriolítica y bactericida	82
Figura 4.1.1	Espectros de dicroísmo circular de SkI	91
Figura 4.1.2	Valoración de SkI con colina	92
Figura 4.1.3	Distribución de los coeficientes de sedimentación de SkI en ausencia y en presencia de 300 mM colina (en distintos tampones)	95
Figura 4.1.4	Dependencia de la masa molecular promedio relativa ($M_{w,app}/M_0$) de SkI con la concentración de colina	96
Figura 4.1.5	Caracterización espectroscópica de la estabilidad térmica de SkI	98
Figura 4.1.6	Dependencia de la estabilidad térmica de SkI con la concentración de colina	100

Figura 4.1.7	Influencia de la velocidad de barrido en los termogramas de Skl registrados en ausencia y en presencia de colina 100 mM	101
Figura 4.1.8	Alineamiento del módulo catalítico de Skl (N-Skl) con los moldes utilizados para la construcción del modelo 3D (PDB: 2K3A y 2K1G) y distribución de los elementos de estructura secundaria	103
Figura 4.1.9	Superposición del modelo 3D de N-Skl con los moldes utilizados	105
Figura 4.1.10	Evaluación estereoquímica y energética del modelo de N-Skl	106
Figura 4.1.11	Comparación de los espectros de DC y la estabilidad térmica de Skl silvestre (Skl wt) y los mutantes C31A y H92A	108
Figura 4.1.12	Distribución de los coeficientes de sedimentación de Skl silvestre y los mutantes C31A y H92A en ausencia y en presencia de colina	109
Figura 4.1.13	Alineamiento de secuencias y elementos de estructura secundaria de los CBMs de Skl (C-Skl) y LytA (C-LytA)	111
Figura 4.1.14	Modelo 3D del CBM de Skl (C-Skl)	113
Figura 4.1.15	Evaluación estereoquímica y energética del modelo 3D de C-Skl	112
Figura 4.1.16	Modelo del dímero de C-Skl e interfaz de dimerización	117
Figura 4.1.17	Perfiles experimentales de SAXS de Skl	119
Figura 4.1.18	Representación de Kratky y distribución de pares de distancias en el espacio real de la partícula en solución	120
Figura 4.1.19	Modelos de esferas generados para el monómero y el dímero de Skl	123
Figura 4.1.20	Disposición de N-Skl y C-Skl en la estructura de Skl y en el complejo Skl/colina	125
Figura 4.1.21	Actividad bacteriolítica y bactericida de Skl y LytA frente a las cepas R6 y D39 de <i>S. pneumoniae</i> y la cepa SK137 de <i>S. mitis</i>	127
Figura 4.1.22	Efecto del pH sobre la actividad bacteriolítica de Skl sobre la cepa SK137 de <i>S. mitis</i>	128
Figura 4.1.23	Influencia de la temperatura y la concentración de enzima en la actividad bacteriolítica de Skl frente a la cepa SK137 de <i>S. mitis</i>	129
Figura 4.2.1	Esquema de construcción de las enzimas quiméricas entre las amidasas LytA y Skl.	133

Figura 4.2.2	Comparación de los espectros de DC en el UV-lejano de LytA, Skl y las quimeras QLAS1 y QSLA2	135
Figura 4.2.3	Valoración con colina de las quimeras QLAS1 y QSLA2; comparación con las enzimas parentales Skl y LytA	137
Figura 4.2.4	Distribución de coeficientes de sedimentación de las quimeras QLAS1 y QSLA2 en ausencia y en presencia de colina	139
Figura 4.2.5	Dependencia de la estabilidad térmica de QLAS1, QSLA2 y las enzimas parentales con la concentración de colina	141
Figura 4.2.6	Comparación de las transiciones calorimétricas correspondientes a la desnaturalización térmica de QSLA1 y QLAS2 con las de las enzimas parentales en ausencia y en presencia de colina 100 mM	143
Figura 4.2.7	Comparación de la actividad antibacteriana de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a la cepa R6 de <i>S. pneumoniae</i>	147
Figura 4.2.8	Efecto de la concentración de LytA y QSLA2 sobre la actividad frente a la cepa R6 de <i>S. pneumoniae</i>	148
Figura 4.2.9	Actividad bacteriolítica de QSLA2 frente a la cepa R6 de <i>S. pneumoniae</i> a distintos pHs	149
Figura 4.2.10	Efecto bacteriolítico/bactericida de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a distintas cepas capsuladas de <i>S. pneumoniae</i>	150
Figura 4.2.11	Efecto bacteriolítico/bactericida de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a distintas cepas multi-resistentes de <i>S. pneumoniae</i>	151
Figura 4.2.12	Efecto bacteriolítico/bactericida de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a la cepa SK137 de <i>S. mitis</i>	152
Figura 4.2.13	Determinación de la CMI de LytA y QSLA2 frente a la cepa ATCC® 49619™. (serotipo 19F) de <i>S. pneumoniae</i>	154
Figura 4.2.14	Ensayo de toxicidad aguda de QSLA2 en embriones de pez cebra	155
Figura 4.2.15	Protección de embriones de pez cebra por QSLA2 contra la infección por <i>S. pneumoniae</i>	156
Figura 5.1	Cavidad catalítica de Skl	189
Figura 5.2	Alineamiento de secuencias de N-Skl y otros dominios CHAP	189
Figura 5.3	Mecanismo catalítico propuesto para Skl	191
Figura 5.4	Superficie de potencial electrostático en diferentes dominios CHAP	193
Figura 5.5	Alineamiento del linker y primeras repeticiones del CBM de Skl y LytA	195

Figura 5.6	Linker de LytA y contactos con el CBM y el módulo catalítico	197
Figura 5.7	Detalle de la estructura del linker y primera repetición del CBM de Skl	199
Figura 5.8	Disposición de la repetición $p6$ y horquilla- β C-terminal en los dímeros de Skl y LytA	201
Figura 5.9	Comparación de las estructuras de los dímeros de Skl y LytA	201
Figura 8.1	Alineamiento de la familia CHAP y secuencia consenso (representación de las 40 primeras secuencias)	247
Figura 8.2	Conservación de aminoácidos de la familia CHAP en N-Skl	249
Figura 8.3	Distribución de los coeficientes de sedimentación del mutante de Skl E109A en ausencia y en presencia de colina	251

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Estirpes bacterianas	52
Tabla 3.2	Plásmidos	54
Tabla 3.3	Oligonucleótidos empleados como cebadores	55
Tabla 3.4	Condiciones de las PCRs para la construcción de los genes quiméricos	60
Tabla 3.5	Reactivos y cantidades empleadas en las PCRs para la construcción de los genes quiméricos	62
Tabla 3.6	Cromóforos más importantes de las proteínas en la región del ultravioleta cercano	67
Tabla 4.1.1	Parámetros hidrodinámicos, en distintos solventes, de la especie mayoritaria de Skl en ausencia y en presencia de colina	94
Tabla 4.1.2	Influencia del pH sobre la $T_{1/2}$ del perfil de desnaturalización de Skl obtenido a 225 nm	99
Tabla 4.1.3	Dependencia del perfil de desnaturalización térmica de Skl a 225 nm con la concentración de colina	99
Tabla 4.1.4	Dependencia de los parámetros de desnaturalización térmica de Skl con la velocidad de barrido y la unión a colina a pH 7,5	102
Tabla 4.1.5	Valores de $T_{1/2}$ de desnaturalización de Skl silvestre y los mutantes C31A y H92A en ausencia y en presencia de colina 300 mM	109
Tabla 4.1.6	Masas moleculares promedio relativas ($M_{w,app}/M_0$) de Skl silvestre y los mutantes C31A y H92A en ausencia y en presencia de colina 300 mM medidas por equilibrio de sedimentación	110
Tabla 4.1.7	Residuos de Skl potencialmente implicados en la formación de los sitios de unión a colina	115
Tabla 4.1.8	Conservación en Skl de los residuos implicados en la dimerización de LytA	116
Tabla 4.1.9	Parámetros estructurales en solución de Skl obtenidos a partir de los perfiles de SAXS	121
Tabla 4.1.10	Parámetros hidrodinámicos obtenidos por diferentes métodos para el monómero y el dímero de Skl	124
Tabla 4.2.1	Comparación de la carga neta a pH 7,0 de Skl y LytA	132

Tabla 4.2.2	Parámetros de unión de colina determinados a partir del ajuste de las curvas de valoración obtenidas por DC en términos de la ecuación de Hill	136
Tabla 4.2.3	Dependencia de la masa molecular aparente relativa ($M_{w,app}/M_0$) de las quimeras QLAS1 y QSLA2 con la concentración de colina	138
Tabla 4.2.4	Comparación de los valores de $T_{1/2}$ de QLAS1, QSLA2 y las enzimas parentales obtenidos a 222 nm en ausencia y en presencia de colina.	142
Tabla 4.2.5	Comparación de los parámetros calorimétricos de la desnaturalización térmica de QLAS1 y QSLA2 con Skl y LytA en ausencia y en presencia de colina 100 mM	145
Tabla 4.2.6	Actividad lítica (U/mg de proteína) sobre paredes de neumococo marcadas con colina tritiada	146
Tabla 4.2.7	Actividad bactericida de las quimeras y sus enzimas parentales sobre distintas cepas de <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. mitis</i>	153
Tabla 8.1	Productos químicos, enzimas y reactivos utilizados	235
Tabla 8.2	Herramientas informáticas utilizadas en este trabajo	239
Tabla 8.3	Secuencias de aminoácidos de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2	243
Tabla 8.4	Secuencias de bases de los genes codificantes para Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2	245

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Amp	ampicilina
Amp ^R	resistencia a ampicilina
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CBM	Módulo de Unión a Colina (de Choline Binding Module)
CBP	Proteína de Unión a Colina (de Choline Binding Protein)
CFU	Unidad Formadora de Colonias (Colony-forming Unit)
CHAP	Cisteína Histidina dependiente Amidohidrolasa/Peptidasa
CM	Módulo Catalítico
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
cpm	cuentas por minuto
C-t	extremo Carboxilo terminal
C+Y	medio CpH8 con un 0,08% de extracto de levadura
DC	Dicroísmo Circular
DEAE -celulosa	Dietilaminoetanol-celulosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpf	días post-fecundación
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry)
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GalNAc	N-acetilglucosamina
hpf	horas post fecundación
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido

IPD	Invasive Pneumococcal Disease (Enfermedad neumocócica invasiva)
LB	Lysogenic Broth (medio lisogénico)
LTAs	Lipo Teichoic Acids (ácidos lipoteicoicos)
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry (espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo)
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina)
MurNAc	ácido N-acetilmurámico
N-t	extremo amino terminal
NSD	Normalized Spatial Discrepancy
ON	toda la noche (Over Night)
PAF	Platelet Aggregation Factor (Factor de Agregación Plaquetario)
PB	Phosphate Buffer (tampón fosfato sódico) 20 mM
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
P-Col	Fosforilcolina
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la DNA polimerasa)
PCV	Pneumococcal Conjugate Vaccine (Vacuna Conjugada contra Neumococo)
PDB	Banco de estructuras de proteínas (Protein Data Bank)
PG	Peptidoglicano
PPV	Pneumococcal Polysaccharide Vaccine (Vacuna Polisacárida contra Neumococo)
p/v	Relación peso/volumen
rpm	revoluciones por minuto
$s_{20,w}$	Coficiente de sedimentación en agua a 20°C
SDS	Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
TFA	Ácido trifluoroacético
U	Unidad/es de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
v/v	relación volumen/volumen
wt	wild type (silvestre)
WTAs	Ácidos teicoicos (Wall Teichoic Acids)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Las endolisinas fágicas y las autolisinas bacterianas representan una nueva clase de antimicrobianos (denominados también enzibióticos) gracias a su capacidad para hidrolizar el peptidoglicano de forma rápida y, generalmente, específica de la especie. La endolisina Skl está codificada por el bacteriófago Φ SK137 de *Streptococcus mitis*, un patógeno oportunista estrechamente relacionado con *Streptococcus pneumoniae*. Skl consta de un módulo catalítico (familia CHAP amidasa) y un módulo de unión a colina (CBM) que se une a la pared bacteriana y que comparte un 64 % de secuencia con el CBM de la principal autolisina de nemococo (LytA), cuyo módulo catalítico pertenece a la familia Amidasa₂. El estudio comparativo de ambas enzimas mediante diferentes aproximaciones biofísicas y bioquímicas ha mostrado que Skl tiene menor afinidad por colina que LytA, requiere concentraciones de colina mucho mayores para formar dímeros, y presenta una escasa actividad bactericida contra *S. pneumoniae* a concentraciones en las que LytA mata eficientemente a este patógeno. Estos resultados indican que su distinta capacidad como enzibióticos podría ser debida, no solo a la distinta actividad intrínseca de los módulos catalíticos, sino a las diferencias de secuencia de sus CBMs.

Según esta hipótesis, la sustitución del CBM de Skl por el de LytA aumentaría tanto la afinidad por colina como la capacidad de dimerización y la actividad bacteriolítica en la quimera resultante (QSLA2) en comparación con Skl silvestre. Por el contrario, la sustitución equivalente en LytA (lisina quimérica QLAS1) debería disminuir estas capacidades con respecto a LytA. Las quimeras QLAS1 y QSLA2 se contruyeron a partir de los genes de las enzimas parentales Skl y LytA, por intercambio de las regiones que codifican los respectivos módulos manteniendo el “linker” que conectaba el módulo catalítico al CBM en la lisina parental. Su aislamiento, con elevado rendimiento, y posterior caracterización ha permitido demostrar la relevancia de esos factores para la actividad bactericida. QSLA2, portadora del módulo catalítico de Skl y el CBM de LytA, mata más eficazmente y a menor concentración que LytA todas las cepas de *S. pneumoniae* y *S. mitis* ensayadas, incluidos aislados clínicos multiresistentes que no son susceptibles a la actividad de LytA. Por el contrario, QLAS1, que comprende el módulo catalítico de LytA y el CBM de Skl, carece de actividad bactericida sobre *S. pneumoniae*, a pesar de que su actividad sobre paredes purificadas es comparable a la de QSLA2. Además, QSLA2 es capaz de proteger a embriones de pez cebra frente a la infección con *S. pneumoniae*, lo que hace de ella un prometedor antimicrobiano contra las infecciones provocadas por el

neumococo. Nuestros resultados proporcionan también nuevas claves sobre el papel que juegan los CBMs, así como la combinación de módulos, en el potencial antimicrobiano de las lisinas de neumococo y otras especies afines, y podrían utilizarse tanto para mejorar o modular la actividad como para diseñar nuevos enzibióticos.

ABSTRACT

Phage endolysins and bacterial autolysins represent a novel class of antimicrobials (known also as enzybiotics) against bacteria due to their unique ability to cleave rapidly the peptidoglycan in a generally species-specific manner. The Skl endolysin is encoded by the Φ SK137 bacteriophage of *Streptococcus mitis*, an opportunistic pathogen closely related to *Streptococcus pneumoniae*. It comprises an N-terminal catalytic module (CHAP amidase family) and a C-terminal choline-binding module (CBM), involved in cell wall-attachment, that shares 64% of sequence with the CBM of LytA, the major pneumococcal autolysin, whose catalytic module belongs to the Amidase_2 family. The comparative study of both amidases using different biophysical and biochemical techniques here reported has revealed that Skl has less affinity for choline than LytA, requires much higher concentrations of choline to form dimers, and displays a poor bacteriolytic activity against *S. pneumoniae* under conditions where LytA efficiently killed this pathogen. These results were indicative that their distinct capacity as enzybiotics could result, apart from dissimilar intrinsic activities of the catalytic modules, from sequence differences in their CBMs.

If this were the case, replacement of the CBM of Skl by that of LytA would improve the choline binding affinity, the dimerization capacity and the bacteriolytic activity of the resulting chimeric lysin (QSLA2) in comparison to Skl wild type. By contrary, the equivalent substitution in LytA (chimeric lysin QLAS1) should depress these capacities with respect to LytA. The QLAS1 and QSLA2 chimeras were built from the genes of the parental enzymes by swapping the regions encoding for the respective modules while preserving, in both constructions, the linker connecting the catalytic module to the CBM in the parental enzyme. The chimeric lysins showed high expression levels, which allowed their structural and functional characterization. As expected, QSLA2 showed higher choline affinity and dimerization ability than Skl and its antimicrobial activity was significantly improved in comparison to both Skl and LytA. Indeed, QSLA2 efficiently killed at very low concentration all the strains of *S. pneumoniae* and *S. mitis* tested, including multiresistant clinic-isolates insensitive to LytA hydrolytic activity. By contrary, QLAS1, that comprises the catalytic module of LytA and the CBM of Skl, showed no bacteriolytic activity against *S. pneumoniae* and its choline binding features approached those exhibited by the Skl endolysin, in agreement, again, with the initial hypothesis. Of note, the lytic activity of QLAS1 on purified cell walls is comparable to that of QSLA2. Also, QSLA2 is able to protect zebrafish embryos from *S. pneumoniae* infection, which

makes of it a promising antimicrobial agent to treat pneumococcal infections. Taken together, our results provide new clues on the role played by the CBM and the module combination in the antimicrobial potential of this family of lysins, that could be of use to improve or modulate their activities, as well as to design new enzybiotics.

"So much universe,
and so little time"

Sir Terry Pratchett

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es hoy, según advierte la OMS, una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo (WHO, 2016a). Para reducir el impacto de este fenómeno y limitar su propagación se deben adoptar medidas que eviten el uso innecesario, masivo e incontrolado de los antibióticos, así como relanzar la investigación y el desarrollo de nuevos antibacterianos. *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno resistente a uno o más antibióticos tradicionales en el 30% de los casos invasivos (CDC, 2015) y ha sido incluido por la OMS entre las 12 bacterias contra las que es prioritario desarrollar nuevos antibióticos (WHO, 2017). En esta introducción se presentan, en primer lugar, los organismos de interés clínico con los que se relaciona nuestro estudio: las bacterias del género *Streptococcus* *S. pneumoniae* y *Streptococcus mitis*, y sus bacteriófagos, virus capaces de infectarlas y destruirlas, con implicaciones en su evolución y patogénesis. Una de las principales dianas para diseñar nuevos tratamientos contra las infecciones bacterianas es la pared celular (estructura imprescindible para su supervivencia) por lo que, como continuación, se describen las estructuras de la pared bacteriana y su peptidoglicano (PG) y las enzimas que estas bacterias emplean para su remodelación durante su ciclo de crecimiento y división, así como las que emplean los bacteriófagos contra

ellas, de forma análoga, para su destrucción al final del ciclo proliferativo. Finalmente se señalan las alternativas que el estudio y conocimiento de estos procesos y de las proteínas implicadas han brindado hasta la fecha, y las posibilidades que abren en el diseño de nuevas estrategias para hacer frente a las infecciones causadas por estas u otras bacterias, incluidas cepas multiresistentes.

1.1. El género *Streptococcus*

El término Streptococcus proviene del griego *strepto* (doblado, retorcido) y *coccus* (baya). Los estreptococos son bacterias Gram-positivas de forma esférica u ovoidea, con un diámetro de menos de 2 μm , que crecen formando parejas o cadenas cortas. Hay más de 100 especies reconocidas y muchas de ellas son patógenas tanto en humanos como en animales. (Hardie & Whiley, 1997; Spellerberg & Brandt, 2011).

Las especies pertenecientes a los grupos *Salivarius*, *Mutans*, *Anginosus* y *Mitis* constituyen los denominados estreptococos orales. Todos ellos son comensales habituales de la cavidad oral y el tracto respiratorio del ser humano y, bajo condiciones propicias, pueden asumir el papel de patógenos oportunistas al invadir la corriente sanguínea y colonizar otros tejidos. El grupo *Mitis* es el más abundante entre los estreptococos orales y a él pertenecen *S. pneumoniae* y *S. mitis*, estrechamente relacionados entre sí (Schachtele *et al.*, 2007). En la actualidad, el grupo *Mitis* lo conforman un mínimo de 18 especies de estreptococos y su identificación precisa en clínica es de vital importancia a la hora de elegir la terapia antimicrobiana correcta. Esto no siempre es posible debido a la enorme semejanza tanto fenotípica como genotípica entre las especies que integran este grupo. Hay que destacar que en todas estas especies la identidad del ARNr 16S supera el 96 %, alcanzando el 99 % en el caso de *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* y *S. oralis* (Arbique *et al.*, 2004; Kawamura *et al.*, 1995).

A diferencia de *S. pneumoniae*, un patógeno humano de la máxima relevancia clínica, *S. mitis*, *S. oralis* o *S. infantis* no suelen causar enfermedades (Maeda *et al.*, 2011; Mitchell, 2011), y las razones que subyacen a esta diferencia de comportamiento son conocidas sólo parcialmente. El mecanismo principal de evolución de *S. pneumoniae* es el intercambio genético con especies relacionadas que comparten el mismo nicho ecológico (Donati *et al.*, 2010), como por ejemplo *S. pneumoniae* y *S. mitis*. Su evolución paralela ha

favorecido el traspaso de genes desde *S. mitis* y, por tanto, la diversificación antigénica de neumococo, generándose así la gran diversidad de serotipos existente en esta bacteria (Kilian *et al.*, 2014). Además se ha demostrado la capacidad de *S. mitis* para adquirir genes de resistencia de otros microorganismos orales y traspasarlos a *S. pneumoniae* (Hannan *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2015). Ello sustenta la hipótesis de que este último es un linaje patogénico dentro del grupo de *S. mitis*, sugiriendo además que, en general, las especies comensales del grupo *Mitis*, y especialmente *S. mitis*, funcionan como reservorios de resistencias a antibióticos.

1.2. *Streptococcus pneumoniae* (neumococo)

1.2.1. Aspectos históricos

S. pneumoniae (comúnmente conocido como neumococo) fue aislado por vez primera en 1880 por Pasteur en Francia y por Sternberg en los Estados Unidos de forma simultánea e independiente. En 1881 Pasteur y sus colaboradores, Chamberlan y Roux, describieron el neumococo como el agente causante de una “nueva enfermedad” provocada experimentalmente en conejos por la inyección de la saliva de un niño que murió a causa de la rabia (Pasteur, 1881; Pasteur *et al.*, 1881). El descubrimiento de Sternberg se publicó tres meses después (Sternberg, 1881) y confirmó las conclusiones del microbiólogo francés. En su estudio publicó: “la inyección de saliva en conejos produce su muerte en 48 h. Encontré un número inmenso de micrococos, usualmente en pares, con un diámetro de 0,5 micras”. Al hilo de este descubrimiento, y con el objetivo de facilitar la visualización de neumococo en el tejido pulmonar, Gram desarrolló en 1884 la tinción que lleva su nombre (Gram, 1884).

Desde su descubrimiento, *S. pneumoniae* ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de la bioquímica y la genética bacteriana e, incluso, en el nacimiento de la biología molecular a lo largo de la segunda mitad del siglo XX. En 1928, al tratar de explicar el mecanismo por el cual se daban variantes de colonias lisas (capsuladas) y rugosas (no capsuladas) de neumococo, Griffith descubrió lo que él llamó “principio transformante”, mediante el cual bacterias vivas sin cápsula (no patógenas) inoculadas junto con bacterias capsuladas (patogénicas) muertas por calor eran capaces de provocar enfermedad, aislándose neumococos capsulados vivos de las muestras procedentes de los animales así infectados (Griffith, 1928).

Este fenómeno sólo podía explicarse asumiendo que las bacterias no capsuladas fueran capaces de adquirir e internalizar, de alguna forma, la información necesaria para sintetizar la cápsula que poseían las bacterias capsuladas muertas. La identificación a nivel molecular de este “principio transformante” fue realizada por Oswald T. Avery y sus colaboradores en el Instituto Rockefeller de Nueva York. Tras una serie de estudios llevados a cabo en los años 30, en 1944 anunciaron uno de los descubrimientos más importantes del siglo XX: la molécula responsable de esa transformación y del traspaso de información era ADN (Avery *et al.*, 1944).

Otros descubrimientos posteriores relevantes que implican estudios con neumococo incluyen la “competencia”, proceso que se refiere a la capacidad de incorporar en el genoma bacteriano fragmentos de ADN monocatenario, los mecanismos por los que se produce la misma y la regulación de la plasticidad genética que implica, tanto para adaptarse al ambiente como para expresar resistencias a antibióticos (Claverys *et al.*, 2000; Håvarstein & Morrison, 1999; Lacks, 1977)

1.2.2. Características generales

S. pneumoniae es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, de entre 0,5 y 1,25 μm , inmóvil, que forma, generalmente, cadenas cortas o diplococos. Cuando se cultiva en placas de agar-sangre en aerobiosis muestra la α -hemólisis típica de los estreptococos viridans (Cole, 1914), mientras que en condiciones anaerobias presenta β -hemólisis debido a la acción de la neumolisina (Ply) (Brzin, 1969). Su genoma tiene una longitud media de 2,1 millones de pares de bases con un contenido en G+C del 40% y aproximadamente sólo el 75% del genoma es común a todos los aislados (Donati *et al.*, 2010). Al igual que en otras bacterias Gram-positivas, la superficie celular de neumococo está formada por una pared celular que contiene varias capas de peptidoglicano (PG), también conocido como mureína, a las que se unen los ácidos teicoicos (WTAs), y por la membrana plasmática, a la que se anclan los ácidos lipoteicoicos (LTAs), como se detalla en el **apartado 1.5**. Rodeando y protegiendo la membrana y la pared celular se encuentra la cápsula polisacáridica.

A nivel bioquímico, una de las características más importantes de neumococo es su requerimiento nutricional absoluto por colina, un componente estructural de WTAs y LTAs (Tomasz, 1967). Como es incapaz de sintetizarla necesita captarla del exterior celular, con lo que su eliminación del medio de cultivo provoca el cese del crecimiento celular

(Rane & Subbarow, 1940). Este aminoalcohol desempeña funciones esenciales en la fisiología de *S. pneumoniae* y *S. mitis*, como se explicará más adelante (**apartado 1.5.2**).

De manera característica, neumococo se lisa rápidamente en presencia de sales biliares como el desoxicolato sódico (Avery & Cullen, 1923; Neufeld, 1900), el cual dispara la acción incontrolada de la principal autolisina de la bacteria, LytA (García *et al.*, 1985; Höltje y Tomasz, 1976; Mosser & Tomasz, 1970), por lo que se utiliza como ensayo para su identificación clínica. Las pruebas para la identificación de neumococo en los laboratorios clínicos incluyen, asimismo, la susceptibilidad a la optoquina (etilhidrocupreína; un derivado de la quinina) (Morgenroth & Levi, 1911) y la reacción capsular en presencia de anticuerpos o reacción de Quellung (Neufeld, 1902). Aunque neumococo es generalmente susceptible a la optoquina, existen cepas resistentes a la misma, mientras que algunos estreptococos del grupo *Mitis* también pueden ser susceptibles a dicho compuesto (Balsalobre *et al.*, 2006; de la Campa *et al.*, 1997; Fenoll *et al.*, 1990; Martín-Galiano *et al.*, 2003), por lo que la identificación es más fiable si las distintas pruebas se realizan conjuntamente (Lund & Henrichsen, 1978).

1.2.3. Importancia clínica, epidemiología y virulencia

Se estima que las enfermedades respiratorias causan un tercio de la mortalidad mundial (4 millones de personas al año) (Morens *et al.*, 2004). En conjunto, la sepsis, la neumonía neonatal y la neumonía comunitaria dan cuenta de casi el 30% de la mortalidad en menores de 5 años (WHO, 2013). La neumonía provoca el 15% de las muertes anuales en este grupo (casi un millón en 2015), siendo *S. pneumoniae* el agente causal predominante tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (WHO, 2016b). Esta tasa de mortalidad convierte a neumococo en el principal patógeno Gram-positivo humano (Schneider, 1999; Williams, 2002). Por otra parte, la estimación de los costes derivados del tratamiento de las infecciones neumocócicas en personas de edad avanzada indica que éstos pueden superar los 5.000 millones de dólares anuales sólo en EE.UU. (Weycker *et al.*, 2010).

S. pneumoniae está presente de forma asintomática en la nasofaringe de un elevado porcentaje de niños sanos (20-40%) y de manera menos frecuente (5-10%) en adultos sanos (Bogaert *et al.*, 2004). Las poblaciones bacterianas que colonizan la nasofaringe de la población infantil

constituyen el principal reservorio de neumococo, a partir de cual surgen y se difunden las resistencias del microorganismo, además de reflejar los aislados circulantes en la comunidad (De Lencastre & Tomasz, 2002). Una vez establecido el estado de portador, lo que sucede a las pocas horas o días del nacimiento (Austrian, 1986; Weiser, 2010), neumococo puede convertirse en un patógeno oportunista, diseminándose y colonizando zonas del cuerpo de forma localizada (mucosas), o bien invadiendo zonas que son normalmente estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo) provocando la enfermedad neumocócica invasiva (IPD), que requiere hospitalización en casi la totalidad de los casos, pudiendo desencadenar incluso la muerte. Es también uno de los patógenos más frecuentes de las infecciones adquiridas en la comunidad.

La colonización e invasión ocurre, principalmente, en el oído medio (produciendo otitis media), los pulmones (neumonía), el sistema nervioso central (meningitis) o el torrente sanguíneo (septicemia) (Mitchell, 2003). La población más susceptible de desarrollar IPD son los neonatos y los niños menores de dos años, las personas de más de 65 años y los pacientes inmunocomprometidos (Drijkoningen & Rohde, 2014). No obstante, la aparición de síntomas clínicos viene condicionada por ciertos factores determinantes de la interacción patógeno-hospedador, como es el serotipo capsular (Weinberger *et al.*, 2010), y por factores del hospedador como la edad, el estado inmunológico, la infección previa del sistema respiratorio por otros patógenos, o aspectos genéticos no bien definidos todavía (Brouwer *et al.*, 2009; Sanders *et al.*, 2011).

Neumococo posee numerosos factores de virulencia (Mitchell & Mitchell, 2010) que le permiten, por un lado, colonizar la nasofaringe humana evitando la respuesta inmune del hospedador y, por otro, el desarrollo de infección activa (Steel *et al.*, 2013). Entre estos factores de virulencia se encuentran numerosas proteínas, como LytA (la principal enzima autolítica de neumococo) o la neumolisina Ply (una proteína citotóxica formadora de poros). Sin embargo, el principal factor de virulencia del neumococo es la cápsula o polisacárido capsular (Brueggemann *et al.*, 2003). Inicialmente descrita por Pasteur como una “aureola que corresponde, quizás, a una sustancia o material mucoso” (Pasteur, 1881), la cápsula es la estructura más externa de la bacteria (**Figura 1.1**). Está formada por polisacáridos compuestos de unidades repetidas de azúcares simples (López & García, 2004) que, en la mayoría de las estirpes estudiadas, están unidos covalentemente bien a los residuos de N-acetilmurámico

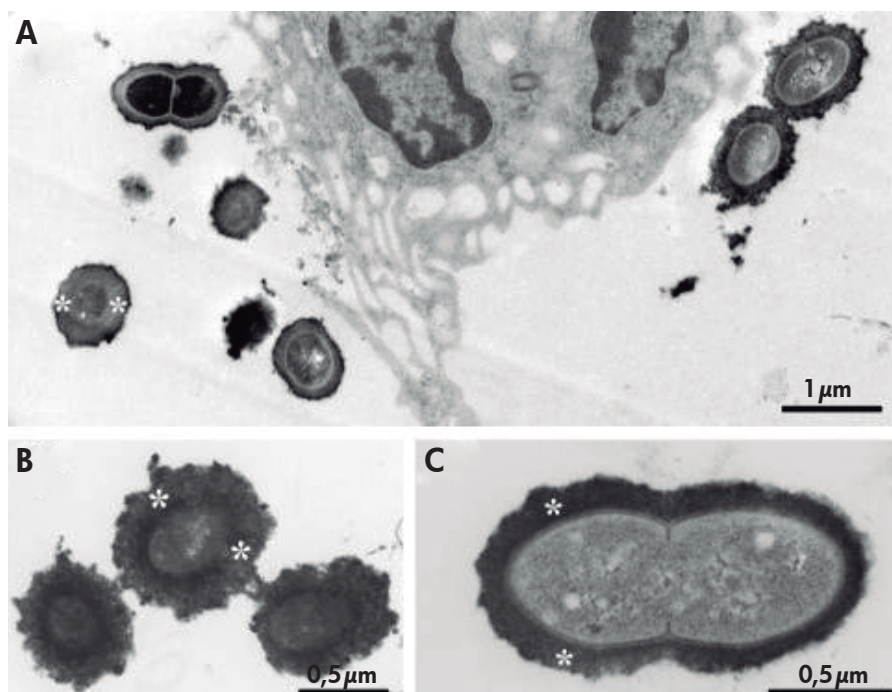


Figura 1.1. *Streptococcus pneumoniae* y su cápsula polisacáridica. Imágenes *in vivo* en tejido pulmonar de ratón correspondientes al serotipo 3 de la cepa A66. Los asteriscos señalan la cápsula (reproducido de Hammerschmidt *et al.*, 2005).

(MurNAc) del PG (Sørensen & Blom, 1992) o bien a componentes de la membrana, aunque a veces pueden liberarse de la célula (Eberhardt *et al.*, 2012; Yother, 2011). Desde que en 1928 Griffith diferenciase entre neumococos rugosos (sin cápsula) y lisos (con cápsula) se han descrito 97 serotipos capsulares y, gracias al desarrollo de nuevas técnicas, se espera que este número vaya en aumento, teniendo en cuenta que las mutaciones puntuales que alteran la actividad de las enzimas encargadas de la síntesis de la cápsula no son inusuales y que, gracias a ellas, un serogrupo puede ser capaz de producir nuevos serotipos. Las distintas variantes del polisacárido capsular vienen determinadas por los monosacáridos que componen la unidad repetitiva, su disposición en la misma y los enlaces que los unen, además del tipo y distribución de los posibles sustituyentes. Esta gran variedad de tipos capsulares puede ser el resultado de la adaptación a la respuesta inmune del hospedador o a otras presiones

ambientales selectivas. Una recopilación de todas las estructuras capsulares conocidas puede encontrarse en Geno *et al.*, 2015.

La cápsula de *S. pneumoniae* juega un papel fundamental en la colonización y la invasión, dificultando o impidiendo la fagocitosis y la retención de la bacteria en el mucus del tracto respiratorio (Kadioglu *et al.*, 2008). Las estirpes que han perdido la capacidad de sintetizar la cápsula son prácticamente avirulentas, como ya mostró Griffith en su famoso experimento, debido a que son eliminadas rápidamente por el sistema inmune. El serotipo determina en gran parte el potencial patogénico; algunos tipos capsulares, independientemente de su historial genético, confieren mayor resistencia a la fagocitosis (Melin *et al.*, 2010) o se expresan a niveles capaces de afectar a la accesibilidad de proteínas de superficie, modificando así la capacidad de colonizar y causar enfermedad (Sanchez *et al.*, 2011). La cantidad de polisacárido capsular también se correlaciona con la virulencia, observándose mayor o menor inflamación o tasas de mortalidad según el serotipo causante de la infección (Martens *et al.*, 2004). Además, los neumococos son capaces de realizar intercambios capsulares entre distintos serotipos (Wyres *et al.*, 2013), lo que da lugar a modificaciones de la virulencia (Kelly *et al.*, 1994) y de la susceptibilidad a determinados antimicrobianos (Muñoz-Almagro *et al.*, 2009; Wyres *et al.*, 2012). En contrapartida, los anticuerpos del sistema inmune del hospedador reconocen los antígenos del polisacárido capsular, promoviendo la opsonización de la bacteria y, por tanto, confiriendo protección al hospedador.

1.2.4. Prevención y tratamiento de la enfermedad neumocócica

1.2.4.a. Vacunas

El desarrollo de vacunas contra neumococo se ha basado en el hecho contrastado de que los anticuerpos contra un serotipo capsular protegían frente a infecciones posteriores causadas por cepas del mismo serotipo o de serotipos que presentasen reacciones cruzadas con aquél (Heidelberger, 1983; Lyall & Odell, 1939; Welch *et al.*, 1939).

En la actualidad se emplean dos tipos diferentes de vacunas contra neumococo:

- **vacunas polisacáridas (PPVs)**, que contienen antígenos polisacáridicos de la cápsula.

- ▶ **vacunas conjugadas (PCVs)**, que contienen una proteína inmunogénica no neumocócica conjugada con polisacárido capsular de neumococo.

Las primeras no consiguen generar memoria inmunológica, ya que inducen una respuesta inmune independiente de linfocitos T, cosa que sí logran las vacunas conjugadas (Clutterbuck *et al.*, 2012).

La vacuna polisacáridica 23-valente (PPV23) está disponible desde 1983 contra los 23 serotipos más comunes de *S. pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F), y su administración se recomienda en niños mayores de 2 años con otras patologías y en personas mayores de 65 años. En el año 2000, la Agencia Federal del Medicamento (FDA) aprobó una vacuna conjugada heptavalente (PCV7) válida para los serotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F, 23F y 6B con eficacia demostrada frente a IPD y episodios de otitis media, aunque moderadamente eficaz contra neumonía. La introducción de la PCV7 en los Estados Unidos provocó un descenso drástico en la incidencia de IPD desde 80 a menos de 1 caso por 100.000 habitantes en 7 años. En 2010 se aprobó una nueva vacuna conjugada 13-valente (PCV13) que ha reemplazado a la heptavalente, puesto que abarca a los serotipos ya cubiertos por ésta, con igual eficacia, más 6 serotipos adicionales (1, 3, 5, 6A, 7F y 19A) (Paradiso, 2011). Esta vacuna se recomienda en niños (desde 2 meses a 6 años) con alto riesgo de desarrollar patologías relacionadas con neumococo (niños con asplenia, anemia falciforme, VIH u otras enfermedades inmunodepresoras, y ciertas patologías crónicas) (CDC, 2016).

La PPV23 protege frente a un número mayor de serotipos que las PCVs, pero tiene sus limitaciones: es muy poco inmunogénica en niños menores de dos años y es poco efectiva contra la neumonía no bacteriémica o la adquirida en la comunidad y contra la IPD en pacientes con patologías crónicas y más de 75 años de edad. Tampoco previene contra la colonización nasofaríngea ni contra infecciones de las mucosas, como puede ser la otitis media. Además, su capacidad para generar anticuerpos parece disminuir con las dosis sucesivas (O'Brien *et al.*, 2007). Este fenómeno de hipo-respuesta de los anticuerpos también se produce con las PCVs (Dagan *et al.*, 2010). Además de este último inconveniente, común con las PPVs, los aspectos negativos de las PCVs son el limitado número de serotipos frente a los que protegen, el elevado coste de cada dosis y

el fenómeno de “reemplazo de serotipo”, por el cual, al inmunizar frente a ciertos serotipos se favorece la proliferación oportunista de otros serotipos no vacunales que son capaces también de causar enfermedad (Brueggemann *et al.*, 2007; Muñoz-Almagro *et al.*, 2008; Weinberger *et al.*, 2011). Además, hay que tener en cuenta que la vacunación puede inducir a que los serotipos cubiertos por las vacunas transfieran, por recombinación, componentes metabólicos y/o asociados a virulencia a los serotipos no cubiertos (Vaccine-Induced Metabolic Shift) (Watkins *et al.*, 2015). Actualmente se encuentran en fase de evaluación vacunas basadas en proteínas antigénicas de neumococo comunes a la mayoría de los aislados clínicos (Cardaci *et al.*, 2012; Lebon *et al.*, 2011; Prevaes *et al.*, 2012) y en bacterias atenuadas (“whole cell vaccines”) (Tarahomjoo, 2014), aunque su eficacia y ventajas sobre las vacunas existentes aún están por demostrar (Feldman & Anderson, 2014).

1.2.4.b. Antibióticos

El tratamiento de las IPDs se ha basado durante casi 40 años en la utilización de la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos, debido a la gran susceptibilidad inicial de neumococo a este antibiótico (Abraham *et al.*, 1941; Keefer *et al.*, 1943; Tillett *et al.*, 1944). A partir de 1965, año en que apareció en Boston el primer caso clínico constatado de neumococo resistente a penicilina (Kislak *et al.*, 1965) se han ido encontrando por todo el mundo neumococos capaces de evadir la acción de los antibióticos (Appelbaum, 1992). En 1967 se aisló una cepa de neumococo resistente tanto a penicilina como a tetraciclina (Hansman & Bullen, 1967), y en 1977 y 1978 se dieron en Sudáfrica dos brotes de infección debidos a neumococos resistentes (Appelbaum *et al.*, 1977; Jacobs *et al.*, 1978), originados en hospitales infantiles donde se trataba a los pacientes de forma rutinaria con antibióticos a modo de profilaxis. En ambos casos, las bacterias parecían haber adquirido material genético que les confería resistencia tanto a penicilina como a otros antibióticos de uso común, confirmándose posteriormente que el estrés del tratamiento con antibióticos induce la transformación genética en neumococo (Prudhomme *et al.*, 2006).

En las décadas siguientes, la resistencia de neumococo a toda una variedad de agentes antimicrobianos ha evolucionado desde ser una mera curiosidad médica a un problema de salud de carácter mundial (WHO, 2014). Las resistencias clínicamente relevantes incluyen a los beta-lactámicos

(penicilinas, cefalosporinas y carbapenós), macrólidos (eritromicina, azitromicina, claritromicina y lincosamidas), tetraciclinas y antagonistas del folato (trimetoprima-sulfametoxazol) (Musher *et al.*, 2001). Asimismo, las mutaciones asociadas a la adaptación fenotípica a las quinolonas han ido incrementándose, al igual que la transferencia de genes asociados a la misma y, aunque todavía no han aparecido altos niveles de resistencia, la trayectoria evolutiva parece seguir ese camino (Ip *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015).

Las tasas de resistencia a uno o varios antibióticos son variables según el mecanismo de acción del mismo llegando, en el caso de la penicilina, hasta el 60% en algunas zonas de Latinoamérica y al 80% en algunos países asiáticos (Appelbaum, 2002). Del mismo modo, también hay que dar importancia a las cepas tolerantes a determinados antibióticos, ya que la imposibilidad de erradicar la infección conlleva una terapia prolongada con antimicrobianos, lo que aumenta la probabilidad de fracaso del tratamiento (Mitchell & Tuomanen, 2002). Por otra parte, la transferencia genética (tanto de resistencias a penicilina y otros antibióticos como de genes de síntesis capsular) entre especies estrechamente relacionadas que colonizan un mismo hábitat (la nasofaringe, en el caso de *S. pneumoniae* y *S. mitis*), ha favorecido la aparición de clones multi-resistentes distribuidos por todo el mundo (Coffey *et al.*, 1991; Klugman, 2002).

Todos estos factores han llevado a que el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) incluya a *S. pneumoniae* en la categoría de “amenaza seria” (McCarthy, 2013) y a que ciertas cepas multirresistentes de neumococo hayan entrado también en la categoría de los denominados “supergérmes”, que se han convertido en el problema de salud pública más acuciante en el mundo (WHO, 2017), especialmente por la incidencia de enfermedades inmunosupresoras o que requieren tratamientos que inmunosensibilizan a los pacientes y que, por tanto, favorecen las infecciones oportunistas con consecuencias fatales.

1.3. *Streptococcus mitis*

1.3.1. Características generales

La fisiología de las células de *S. mitis* es muy similar a la de *S. pneumoniae*, su pariente genético más cercano. Éstas crecen en parejas o en cadenas cortas y su forma se asemeja a una punta de flecha, con una longitud de unos 0,5 μm (**Figura 1.2**). *S. mitis* es una bacteria mesófila, α -hemolítica, anaerobia facultativa y catalasa negativa que coloniza tanto las mucosas como las superficies duras de la cavidad oral y forma parte de la flora bucal. El genoma de *S. mitis* ha sido secuenciado y consta de aproximadamente 2 millones de pares de bases que varían entre las diferentes cepas. Su contenido en G+C es del 40,4% e incluye un total de 2222 genes (TIGR CMR Genome Database, DNA Fact Table Accessed: Aug 26, 2007).

La comparación del genoma de la cepa B6 de *S. mitis* con el de distintas cepas de *S. pneumoniae*, ha permitido identificar los factores genéticos que los diferencian, pero además comprobar que la mayoría de los factores de virulencia presentes en neumococo también están presentes en el genoma de *S. mitis* (Denapaité *et al.*, 2010; Mitchell, 2011). Los resultados más interesantes muestran la presencia de 22 proteínas de unión a la colina de la pared bacteriana (CBPs) en *S. mitis* B6 que son de sobra conocidas en *S. pneumoniae* por su implicación en la virulencia, en las interacciones con el hospedador y en la fisiología bacteriana (Denapaité *et al.*, 2010), así como de otras proteínas de superficie importantes en adherencia e invasión (Madhour *et al.*, 2011). Asimismo, se ha identificado en ciertos aislados de *S. mitis* una citolisina dependiente de colesterol, denominada mitilisina, cuya secuencia difiere en 15 aminoácidos de la neumolisina Ply de neumococo (Jefferies *et al.*, 2007). Considerando el intercambio genético entre ambas bacterias, este hallazgo puede tener implicaciones en el desarrollo de vacunas o terapias contra la enfermedad neumocócica basadas en Ply y sus propiedades (Jefferies *et al.*, 2007).

En un principio se pensaba que *S. mitis* no tenía cápsula. Sin embargo, se han encontrado secuencias de genes asociados a distintos tipos de cápsulas en algunas cepas (Kilian *et al.*, 2008; Rukke *et al.*, 2012). Al igual que en *S. pneumoniae*, las variantes capsulares serían debidas a la adaptación a la respuesta inmune del hospedador y otras presiones selectivas. A diferencia de neumococo, el papel de la cápsula en la patogenicidad de *S. mitis* aún no ha sido establecido totalmente, excepto por sus efectos

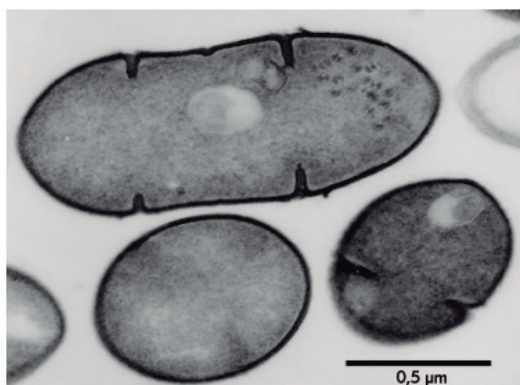


Figura 1.2. *Streptococcus mitis*.

Imagen de microscopía electrónica de *S. mitis* SF100 (reproducido de Mitchell *et al.*, 2007).

negativos sobre la formación de biofilmes *in vitro* (Rukke *et al.*, 2012). Aunque parece conferir protección frente a su eliminación por parte del hospedador en etapas tempranas de infección pulmonar, en modelos de bacteriemia la cápsula de mitis no parece jugar un papel tan importante en la virulencia como otros factores genéticos de la bacteria: a diferencia de neumococo, la cápsula no protege a mitis de su eliminación en sangre. Este hecho podría contribuir a explicar las diferencias en su potencial patogénico y estar relacionado con la evolución y adaptación de mitis hacia un estilo de vida preferentemente comensal (Rukke *et al.*, 2014).

1.3.2. Importancia clínica

A pesar de ser considerado un comensal relativamente benigno de la flora oral, *S. mitis* es también un patógeno oportunista, aunque poco frecuente, en niños y adultos sanos, capaz de causar desde caries a enfermedades invasivas (Mitchell, 2011). Dentro del grupo de los estreptococos orales es el principal causante de bacteriemia y también de endocarditis, una patología emergente que se caracteriza por la formación de acumulaciones de plaquetas, fibrina, microorganismos y células inflamatorias, que afectan a las válvulas cardíacas, en las que las cepas de *S. mitis* implicadas presentan resistencias a los antibióticos comunes (Millar & Moore, 2004, Seo *et al.*, 2010). Es, además, una causa emergente de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes inmunocomprometidos (Husain *et al.*, 2005; Shelburne *et al.*, 2014). Por otro lado, *S. mitis* ha sido asociado a brotes del síndrome del choque tóxico con niveles de mortalidad superiores al 60% (Lu *et al.*, 2003; Tunkel & Sepkowitz, 2002).

Aunque se sabe poco acerca de cómo *S. mitis* causa estas enfermedades, la unión de la bacteria a las plaquetas está implicada de forma directa en la patogénesis de la endocarditis infecciosa (Seo *et al.*, 2010). La capacidad para incorporar de forma efectiva DNA foráneo a su genoma ha favorecido, asimismo, el desarrollo de cepas agresivas causantes de sepsis y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (Catto *et al.*, 1987; Elting *et al.*, 1992) y las infecciones por cepas multi-resistentes se han ido convirtiendo gradualmente en prevalentes entre pacientes inmunodeprimidos (Doern *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 2013). Estos hechos han de tenerse en cuenta no sólo a la hora de realizar una selección apropiada de antibióticos para tratar tanto la endocarditis como la bacteriemia causadas por *S. mitis*, sino también por la capacidad de éste para donar genes de resistencias a *S. pneumoniae* (Cerdá Zolezzi *et al.*, 2004). Por otra parte, dada la emergencia de cepas de *S. pneumoniae* no cubiertas por las vacunas, es crítico analizar el potencial de *S. mitis* como donador de genes que codifican estructuras de la cápsula, dando lugar a alteración de epítomos en la misma, incluidos aquellos contra los que están dirigidas las actuales vacunas contra neumococo.

En resumen, la incidencia clínico-sanitaria de las infecciones originadas por ambos patógenos, la moderada eficacia de las vacunas actuales en el caso de neumococo (Brueggemann *et al.*, 2007), y la creciente aparición de cepas resistentes o tolerantes a antibióticos (Link-Gelles *et al.*, 2013; McCormick *et al.*, 2003; Sánchez-Tatay *et al.*, 2008) hacen que la búsqueda de tratamientos alternativos contra las enfermedades causadas por ambos microorganismos sea una necesidad de primer orden.

1.4. Los bacteriófagos

Los bacteriófagos (o simplemente fagos) son virus que infectan exclusivamente a las bacterias y constituyen las entidades más abundantes de la biosfera (aproximadamente 10^{31}) (López & García, 2004). Los primeros indicios de su existencia datan de 1896, cuando el químico británico Ernest Hanbury Hankin, estudiando la malaria y el cólera en la India, sugirió la presencia de actividad antibacteriana en el agua de los ríos Ganges y Yamuna (Hankin, 1896). La constatación de que esas partículas que mataban bacterias eran organismos en sí mismos no llegó hasta dos décadas después cuando, de forma independiente,

Frederick W. Twort (Twort, 1915) y Félix D'Hérelle (D'Hérelle, 1917) descubrieron los bacteriófagos, siendo este último quien les dio su nombre (Summers, 2001).

El ciclo de vida de un bacteriófago requiere la interacción con un hospedador bacteriano para poder llevar a cabo su replicación (**Figura 1.3**). Atendiendo a esto, los fagos pueden clasificarse en:

- **fagos virulentos o líticos:** las células hospedadoras son destruidas tras la infección y replicación del virión y los nuevos virus quedan libres para llevar a cabo una nueva infección (ciclo lítico).
- **fagos atemperados:** el genoma vírico se integra en el DNA del hospedador, replicándose junto con el DNA bacteriano, o permanece como un plásmido, pasando a la siguiente generación cuando la bacteria se divide (ciclo lisogénico).

Los fagos atemperados permanecen como un profago inactivo hasta que la aparición de condiciones adecuadas induce el inicio del ciclo lítico y con él la lisis de la bacteria hospedadora.

Algunos fagos virulentos experimentan un fenómeno conocido como inhibición de la lisis, mediante el cual la progenie fágica no induce la lisis de la célula hospedadora cuando la concentración externa de viriones es alta. En ocasiones, los profagos otorgan beneficios a la bacteria hospedadora mientras permanecen en estado letárgico, al incorporarle nuevas funciones a su genoma, en un fenómeno conocido como conversión lisogénica (Waldor & Mekalanos, 1996; Keen, 2012).

Los fagos han contribuido de forma fundamental a la evolución de las bacterias. La infección por fagos atemperados conlleva la posible integración de su DNA en la bacteria, lo que ha provocado el traspaso tanto de genes relacionados con virulencia como con resistencias (Banks *et al.*, 2002; García *et al.*, 2005). Su abundancia en aislados clínicos de neumococo podría alcanzar niveles cercanos al 75% según Ramírez *et al.*, (1999), siendo también una de las causas de la diversificación génica y del desarrollo de nuevos serotipos de neumococo y mitis. Esto hace que los fagos sean también un elemento importante para la respuesta del organismo hospedador a las infecciones bacterianas debido, entre otros factores, a su contribución en la formación de biofilms, a la secreción de toxinas o la producción de proteínas que alteran las propiedades

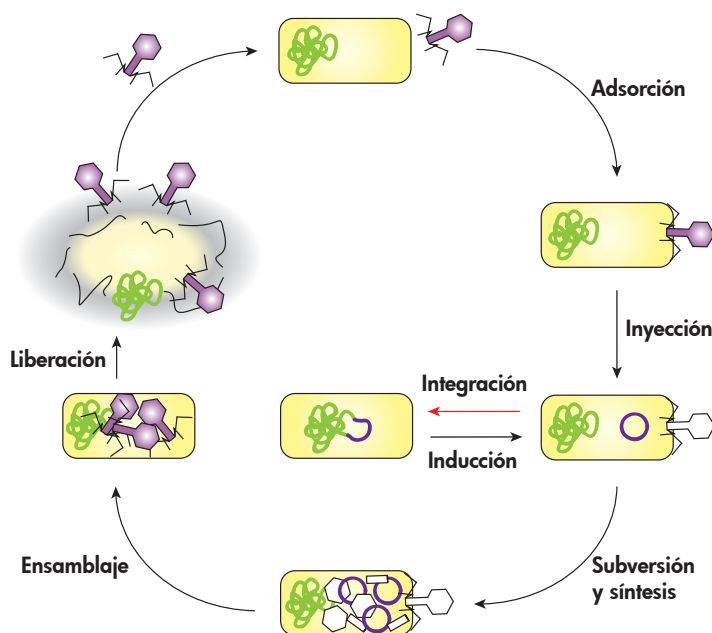


Figura 1.3. Ciclos de vida de un bacteriófago. Ciclo lítico: tras la adsorción y la inyección del material genético en la bacteria hospedadora comienza la replicación y síntesis del virus, continuando con su ensamblado y la liberación de la progenie, destruyendo la célula hospedadora. Ciclo lisogénico: tras la inyección, el material genético del virus se integra en el genoma bacteriano o permanece como un plásmido, a la espera de condiciones que provoquen la inducción y entrada en el ciclo lítico (basado en Sturino & Klaenhammer, 2006).

antigénicas de la bacteria o aumentan la resistencia al suero en Gram-negativos (Fortier & Sekulovic, 2013; Pedulla *et al.*, 2003).

Los fagos de neumococo son en su mayoría atemperados (HB, Ej-1, MM1 y VO1 entre otros): más de la mitad de los aislados clínicos son lisogénicos (Romero *et al.*, 2009a, 2009b), aunque también existen fagos virulentos, como los del tipo Cp y Dp (García *et al.*, 2005). Los fagos de *S. mitis* conocidos hasta el momento son mayoritariamente atemperados (SM1, ΦB6, ΦHER y ΦSK137) (Bensing *et al.*, 2001; Llull *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2004) y tan sólo se ha identificado uno de tipo virulento (vB_SmM_GEC-S mitisM_2) (Rigvava *et al.*, 2013) (**Figura 1.4**). El fago Cp-1 no actúa exclusivamente en un hospedador, pudiendo infectar

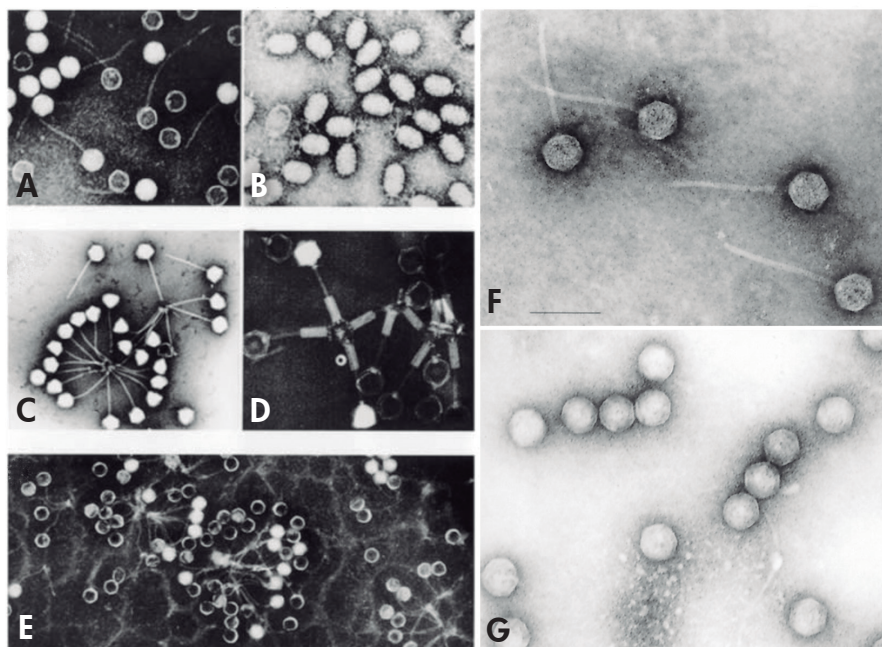


Figura 1.4. Bacteriófagos de *S. pneumoniae* y *S. mitis*. Micrografías electrónicas de los fagos de neumococo (A) Dp-1; (B) Cp-1; (C) HB-3; (D) EJ-1; (E) MM1; y de los fagos de mitis (F) SM1 y (G) SM1ΔAB. Barra, 100 nm. Tomado de López, 2004 y Bensing *et al.*, 2001.

y replicarse, además de en *S. pneumoniae*, en *S. oralis* (Ronda *et al.*, 1989) y en *S. mitis*, quien también es susceptible de ser infectado por el fago Dp-1 de neumococo (Ouennane *et al.*, 2015).

El mayor obstáculo con el que se encuentran los fagos al final del ciclo lítico, cuando llega el momento de la liberación y dispersión de la progenie viral desde el interior de la bacteria, es la barrera creada por el PG (véase **apartado 1.5**). La mayoría de los fagos, entre ellos los de neumococo, deben causar la lisis de la bacteria para acceder al exterior e infectar a otras bacterias, y el deterioro de la pared debe ser rápido frente a un posible competidor (Young, 2014; Young *et al.*, 2000). Para ello, todos los fagos de DNA de doble cadena producen una enzima lítica que rompe desde el interior (endolisina) los enlaces del PG, y que requiere para ello, tanto en Gram-positivas como en Gram-negativas, la acción de unas pequeñas proteínas llamadas holinas. Las holinas se acumulan

en la membrana plasmática bacteriana produciendo poros de tamaño suficiente para que las endolisinas accedan a la pared y puedan hidrolizarla (Díaz *et al.*, 1996; García *et al.*, 1997; Martín *et al.*, 1998; Young, 1992). En bacterias Gram-negativas, debido a la presencia de la membrana externa, la salida de la progenie fágica requiere, además, la participación de las o-spaninas (Young, 2014).

Esta capacidad de los fagos para inducir la lisis bacteriana es una de las principales razones del creciente interés que suscitan los fagos líticos (Biswas *et al.*, 2002; Sulakvelidze & Morris, 2001; Summers, 2001; Vandenheuvel *et al.*, 2015) y las endolisinas como agentes terapéuticos en el tratamiento específico de las infecciones causadas por sus bacterias hospedadoras (Fischetti, 2005; Hermoso *et al.*, 2007; Pastagia *et al.*, 2013) y de su inclusión dentro de las alternativas a los antibióticos clásicos que deberían potenciarse durante los próximos años (Czaplewski *et al.*, 2016).

1.5. La pared celular bacteriana

Las bacterias han desarrollado una pared celular, a modo de exoesqueleto, como mecanismo de protección frente al medio externo (**Figura 1.5**). La pared da forma y rigidez a la célula, protegiéndola de su posible lisis osmótica o mecánica (Salton, 1994), aunque mantiene la flexibilidad necesaria para permitir su adaptación a los cambios morfológicos que la bacteria experimenta durante las fases de crecimiento, división e infección. El mantenimiento de la integridad de la pared celular, cuya estructura está en continua biosíntesis y remodelación, es esencial para la viabilidad de las bacterias y constituye una de las principales dianas para el diseño de antibióticos (Lovering *et al.*, 2012). Además de ser el medio de intercambio de solutos entre el exterior y el interior celular, en bacterias Gram-positivas la pared celular sirve de punto de unión para toda una batería de proteínas implicadas tanto en procesos de crecimiento y división celular como en las interacciones de la célula con el medio exterior (McCullers & Tuomanen, 2001), desempeñando un papel importante en los procesos de colonización, adherencia, inflamación e invasión bacteriana (Greene *et al.*, 2015; McCullers & Tuomanen, 2001; Tuomanen *et al.*, 1985, 1987).

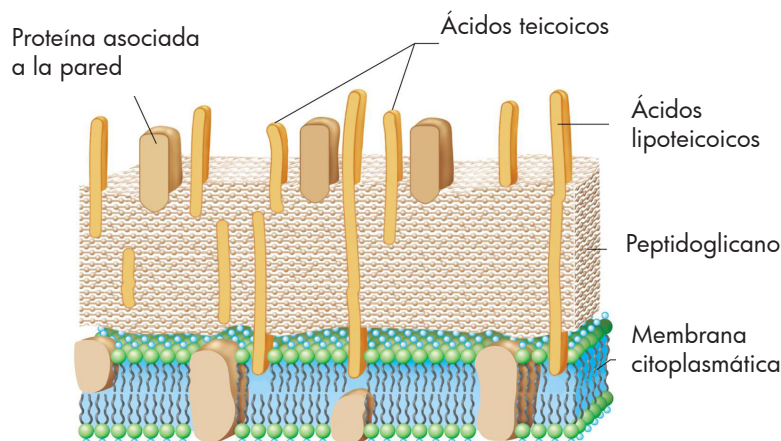


Figura 1.5. Esquema de la organización de los componentes de la membrana y la pared celular en bacterias Gram-positivas.

1.5.1. El peptidoglicano

El peptidoglicano (PG) o mureína es uno de los componentes esenciales de la pared celular bacteriana. Se encuentra rodeando a la membrana citoplasmática de la mayoría de las bacterias y es el responsable del mantenimiento de la estructura de la célula, por lo que la inhibición de su biosíntesis o su degradación durante la fase de crecimiento bacteriano da lugar a la lisis celular (Fisher & Mobashery, 2010; Vollmer, 2008). Desde el punto de vista químico, el PG es un heteropolímero formado por largas cadenas glicánicas entrecruzadas por cortos segmentos peptídicos.

Tanto en bacterias Gram-positivas como en las Gram-negativas, las cadenas glicánicas están constituidas por residuos alternantes de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) y *N*-acetil-murámico (MurNAc) unidos mediante enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) (Weidel & Pelzer, 1964), mientras que la composición de los péptidos puede variar (García-Bustos & Tomasz, 1990; García-Bustos *et al.*, 1987). La unión entre el polisacárido y la cadena peptídica tiene lugar a través de enlaces amida con el grupo D-lactilo en posición 3 del anillo de cada residuo del MurNAc. La composición más habitual de las cadenas peptídicas en el PG naciente de neumococo o mitis es L-Ala-D-isoGln-L-Lisina-D-Ala-D-Ala (**Figura 1.6**).

El último o los dos últimos residuos de D-Ala desaparecen del PG maduro tras la acción de las carboxipeptidasas, disminuyendo la proporción del pentapéptido (Bui *et al.*, 2012; Schleifer & Kandler, 1972).

En el PG de neumococo los segmentos peptídicos conectan entre sí las cadenas glicánicas a través de la unión del grupo carboxilo de la D-Ala en posición 4 y el grupo amino de la cadena lateral de la L-Lys en posición 3, bien directamente o a través de pequeños puentes peptídicos cuya composición más frecuente en neumococo es L-Ser-L-Ala o L-Ala-L-Ala (Bui *et al.*, 2012; Fischer & Tomasz, 1985). Este entrecruzamiento de las cadenas glicánicas crea el entramado tridimensional que caracteriza a la gran macromolécula que es el PG y tiene lugar mediante una reacción de transpeptidación por las mismas enzimas bifuncionales que llevan a cabo la síntesis de las cadenas glicánicas (Fisher & Mobashery, 2010). En la cepa R6 de neumococo el porcentaje de monómeros no entrecruzados es del orden del 37% (Bui *et al.*, 2012). Tanto la longitud de las cadenas como el nivel de entrecruzamiento varía entre especies, cepas, condiciones de crecimiento y/o estadio celular, factores ambientales, etc., y es independiente del grosor del PG (Moynihan *et al.*, 2014; Vollmer, 2008; Vollmer & Seligman, 2010). La orientación de las cadenas de mureína respecto a la superficie de la bacteria está aún por determinar (Dmitriev *et al.*, 2005; Meroueh *et al.*, 2006; Vollmer & Seligman, 2010).

Las cadenas glicánicas sufren modificaciones estructurales secundarias que pueden alterar tanto la hidrólisis como la síntesis del PG y afectan, principalmente, al grupo amino en posición C2 (*N*-desacetilación) o al hidroxilo del C6 (*O*-acetilación) de los amino azúcares. La *N*-desacetilación del PG tiene lugar fundamentalmente en bacterias Gram-positivas y puede afectar a los residuos de GlcNAc y MurNAc (Moynihan *et al.*, 2014), siendo particularmente importante en el PG de neumococo (Vollmer & Tomasz, 2000). La *O*-acetilación, por el contrario, solo se ha observado en los residuos de MurNAc (Crisóstomo *et al.*, 2006; Vollmer, 2008) y aparece tanto en bacterias Gram-positivas como negativas.

1.5.2. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos

Neumococo contiene otros dos glicopolímeros asociados a su envuelta celular: los ácidos teicoicos (WTAs) o polisacárido C, unidos covalentemente al PG a través de la posición 6 del MurNAc (**Figura 1.6**) y los ácidos lipoteicoicos (LTAs) o antígeno de Forssman, anclados mediante un glicolípido a la membrana celular (Fischer, 2000). A diferencia de lo que

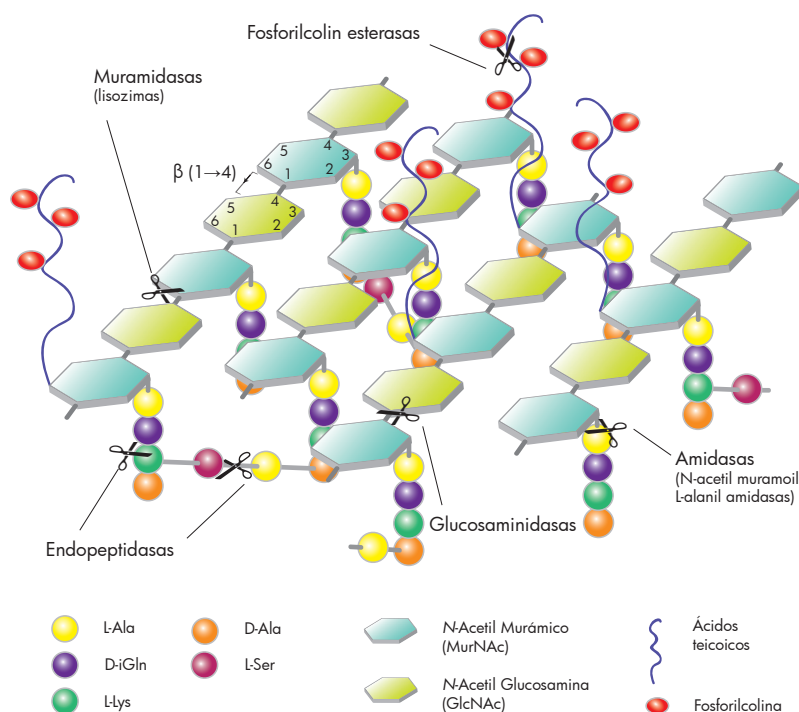


Figura 1.6. Representación esquemática de los componentes del peptidoglicano de *S. pneumoniae*. Se señalan los enlaces hidrolizados según el tipo de actividad enzimática que pueden presentar las PG hidrolasas.

ocurre en otras bacterias Gram-positivas, la composición de ambos es idéntica en neumococo y están formados por unidades repetidas del pentasacárido representado en la **Figura 1.7**, cuya principal característica es la presencia de fosforilcolina (P-Col) como sustituyente en los residuos de N-acetil-galactosamina (GalNAc) (Fischer, 2000; Gisch *et al.*, 2013).

La envuelta celular de *S. mitis* también posee WTAs y LTAs prácticamente con la misma composición que en *S. pneumoniae* y que, al igual que éstos, contienen colina (Denapaite *et al.*, 2012). La mayoría de las cepas biovar 1 y otras variantes de mitis presentan un WTA adicional, ausente en neumococo, que no contiene ni ribitol ni glicerol-fosfato. Su unidad repetitiva es un heptasacárido de galactosa y glucosa que carece de fosforilcolina (**Figura 1.8**) y se considera como el antígeno propio de las mismas (Bergström *et al.*, 2000).

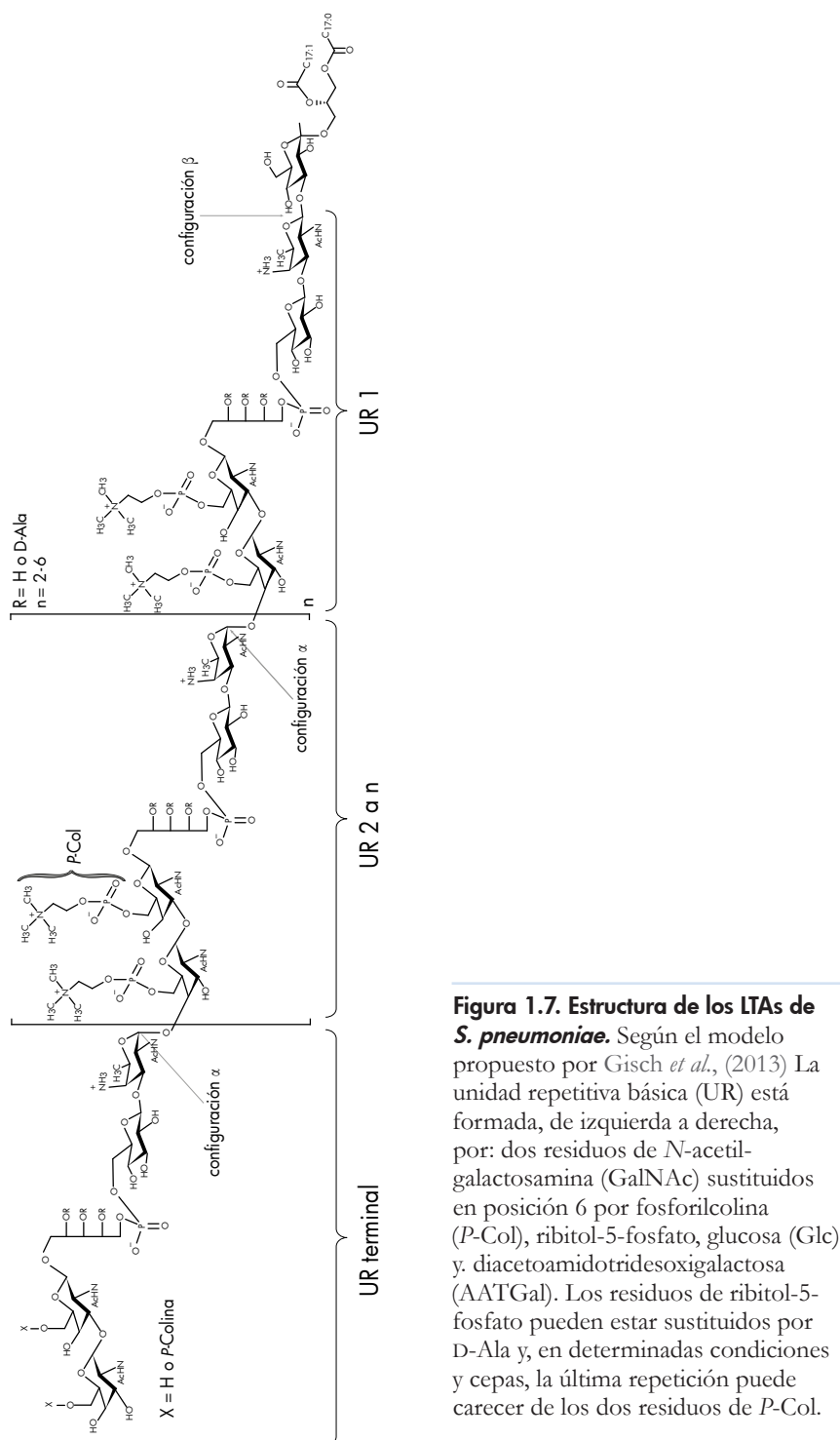


Figura 1.7. Estructura de los LTAs de *S. pneumoniae*. Según el modelo propuesto por Gisch *et al.*, (2013) La unidad repetitiva básica (UR) está formada, de izquierda a derecha, por: dos residuos de *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) sustituidos en posición 6 por fosforilcolina (*P-Col*), ribitol-5-fosfato, glucosa (Glc) y diacetoamidotridesoxigalactosa (AATGal). Los residuos de ribitol-5-fosfato pueden estar sustituidos por D-Ala y, en determinadas condiciones y cepas, la última repetición puede carecer de los dos residuos de *P-Col*.

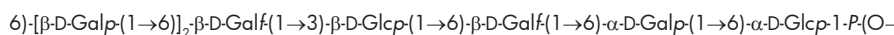


Figura 1.8. Unidad repetitiva del WTA específico de *Streptococcus mitis*. Presente de forma adicional en ciertas cepas biovar 1, junto con los WTA típicos de neumococo (Bergström *et al.*, 2000). Gal, galactosa; Glc, glucosa; *p* y *f*, formas piranosa y furanosa, respectivamente.

Por su distribución homogénea sobre la pared celular, los WTAs y LTAs podrían actuar como barrera para evitar la difusión de nutrientes y metabolitos (Beveridge, 1981; Fischer *et al.*, 1993). Además, la carga negativa de los grupos fosfato les confiere la capacidad de formar quelatos, aumentando así la rigidez de la pared celular (Neuhaus & Baddiley, 2003), mientras que los grupos D-Ala unidos al ribitol-fosfato confieren a la bacteria resistencia frente a la acción de péptidos antimicrobianos de tipo catiónico (Kovács *et al.*, 2006). Los LTAs están también implicados en la respuesta inmune del hospedador, iniciando las cascadas inflamatorias por la activación de la vía del complemento (Draing *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2008; Weidenmaier & Peschel, 2008).

Neumococo es auxótrofo para la colina (Rane & Subbarow, 1940), un aminoalcohol abundante en eucariotas pero muy raro en bacterias. La *P-Col* tiene un papel importante en la patogenicidad del neumococo. Participa directamente en la internalización de la bacteria, interactuando con los receptores celulares del factor de agregación plaquetario o PAF (Cundell *et al.*, 1995; Hergott *et al.*, 2015) y, durante el proceso de inflamación, es reconocida por la proteína C-reactiva humana, implicada en la respuesta inmune del hospedador (Mold *et al.*, 1982). Por otra parte, los residuos de *P-Col* actúan como receptores para toda una familia de proteínas codificadas tanto por *S. pneumoniae* como por *S. mitis*, denominadas genéricamente CBPs (del inglés “Choline Binding Proteins”), entre las que se encuentran las enzimas producidas para hidrolizar los enlaces de la pared celular (PG hidrolasas). Las alteraciones en la incorporación de colina a la pared celular de neumococo afectan a la composición de la misma, y los cambios morfológicos observados en el crecimiento de las células y en la separación de las células hijas pueden explicarse por la disminución de la actividad de las PG hidrolasas (De Las Rivas *et al.*, 2002; Sanchez-Puelles *et al.*, 1986; Tomasz, 1968).

Aunque la P-Col es un componente poco habitual en bacterias, está presente en las estructuras periféricas de otros patógenos del tracto respiratorio como son *S. oralis*, *S. constellatus*, *Neisseria meningitidis*, y *S. pseudopneumoniae* (Gosink *et al.*, 2000; Kilian *et al.*, 2008) y en la mayoría de las cepas de *S. mitis* (las que no presentan colina contienen etanolamina), mientras que las cepas de *S. infantis* muestran un contenido variable de los dos epítomos (Kilian *et al.*, 2008). Las cepas de *S. mitis* podrían codificar para 22 CBPs mientras que *S. oralis* podría codificar 10 (Madhour *et al.*, 2011). Por otro lado, un número importante de las CBPs de la cepa B6 de *S. mitis* no se encuentra en *S. pneumoniae* (Denapaite *et al.*, 2010; Hakenbeck *et al.*, 2009), mientras que otras están presentes en muchas cepas de *S. mitis*, *S. oralis*, y *S. pneumoniae* (Madhour *et al.*, 2011; Moscoso *et al.*, 2005). La secuenciación de numerosos genomas bacterianos en los últimos años ha puesto también de manifiesto la posible existencia de proteínas similares a las CBPs de neumococo y de otros estreptococos del grupo *Mitis* (García *et al.*, 2000) en otras familias bacterianas más alejadas filogenéticamente como *Actinomycetaceae*, *Bacillaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* (Del Cerro *et al.*, 2013; Demarest *et al.*, 2005; García *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2005), *Carnobacteriaceae* (Morales, 2014), *Eubacteriaceae* y *Erisipelotrichaceae* (Ogawa *et al.*, 2011; To & Nagai, 2007). Su presencia ha sido descrita también en el lipo-oligosacárido de *Haemophilus influenzae* no tipable (Young *et al.*, 2013).

1.6. Peptidoglican-hidrolasas codificadas por *S. pneumoniae*, *S. mitis* y sus bacteriófagos

Las PG hidrolasas o murein hidrolasas bacterianas hidrolizan de forma específica los enlaces covalentes del peptidoglicano y, en consecuencia, participan en la remodelación continua que éste experimenta, principalmente durante los procesos de crecimiento y división celular. Eventualmente, estas enzimas pueden causar la lisis celular, recibiendo entonces el nombre de autolisinas; por ello se encuentran altamente reguladas (Vollmer *et al.*, 2008). La actividad hidrolítica de algunas de las PG hidrolasas de neumococo y mitis requiere su unión a la envuelta bacteriana, mediante el reconocimiento de los residuos de colina presentes en WTAs y LTAs. La presencia de colina en la pared celular de ambos microorganismos parece haber condicionado también la estructura de las endolisinas

codificadas por sus fagos, con excepción del fago Cp-7 de *S. pneumoniae*, cuya endolisina, Cpl-7, hidroliza bacterias crecidas en presencia de colina o etanolamina (Llull *et al.*, 2006; López & García, 2004; Romero *et al.*, 2004).

Las PG hidrolasas dependientes de colina muestran una organización modular de la cadena polipeptídica y contienen, al menos, un módulo de unión a colina (CBM) que determina la especificidad hacia el sustrato, y otro catalítico que determina el tipo de enlace hidrolizado (**Figuras 1.6 y 1.9**).

Dependiendo del tipo de enlace hidrolizado las PG hidrolasas se clasifican en:

- **Amidasas** (*N*-acetil-muramoil-L-alanil amidasas): hidrolizan el enlace amida entre el grupo D-lactilo del MurNAc y el grupo amino de la L-alanina del segmento peptídico.
- **Glucosaminidasas**: pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas e hidrolizan el enlace β (1 \rightarrow 4) entre los residuos de GlcNAc y MurNAc.
- **Lisozimas o muramididasas**: también pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas. Son β -*N*-acetilmuramididasas e hidrolizan el enlace glicosídico MurNAc β (1 \rightarrow 4) GlcNAc.
- **Transglicosilasas**: tienen la misma actividad que las lisozimas pero generan 1,6-anhidromurámico, bloqueando el extremo reductor de la cadena glicánica tras la hidrólisis.
- **Endopeptidasas y carboxipeptidasas**: hidrolizan los enlaces peptídicos, aunque las carboxipeptidasas se limitan a separar solamente el aminoácido C-terminal del segmento peptídico.
- **Fosforilcolin esterases**: dentro de las PG hidrolasas de neumococo y mitis también se incluye a Pce, la enzima que libera los residuos de fosforilcolina de los WTAs y LTAs y que hidroliza al PAF (Hermoso *et al.*, 2005; Hergott *et al.*, 2015)

El CBM está formado por la repetición en tándem de un motivo conservado de secuencia que contiene 17-23 aminoácidos, variando el número de repeticiones y su posición en la cadena de unas enzimas a otras (Llull *et al.*, 2006; López & García, 2004; Romero *et al.*, 2004)

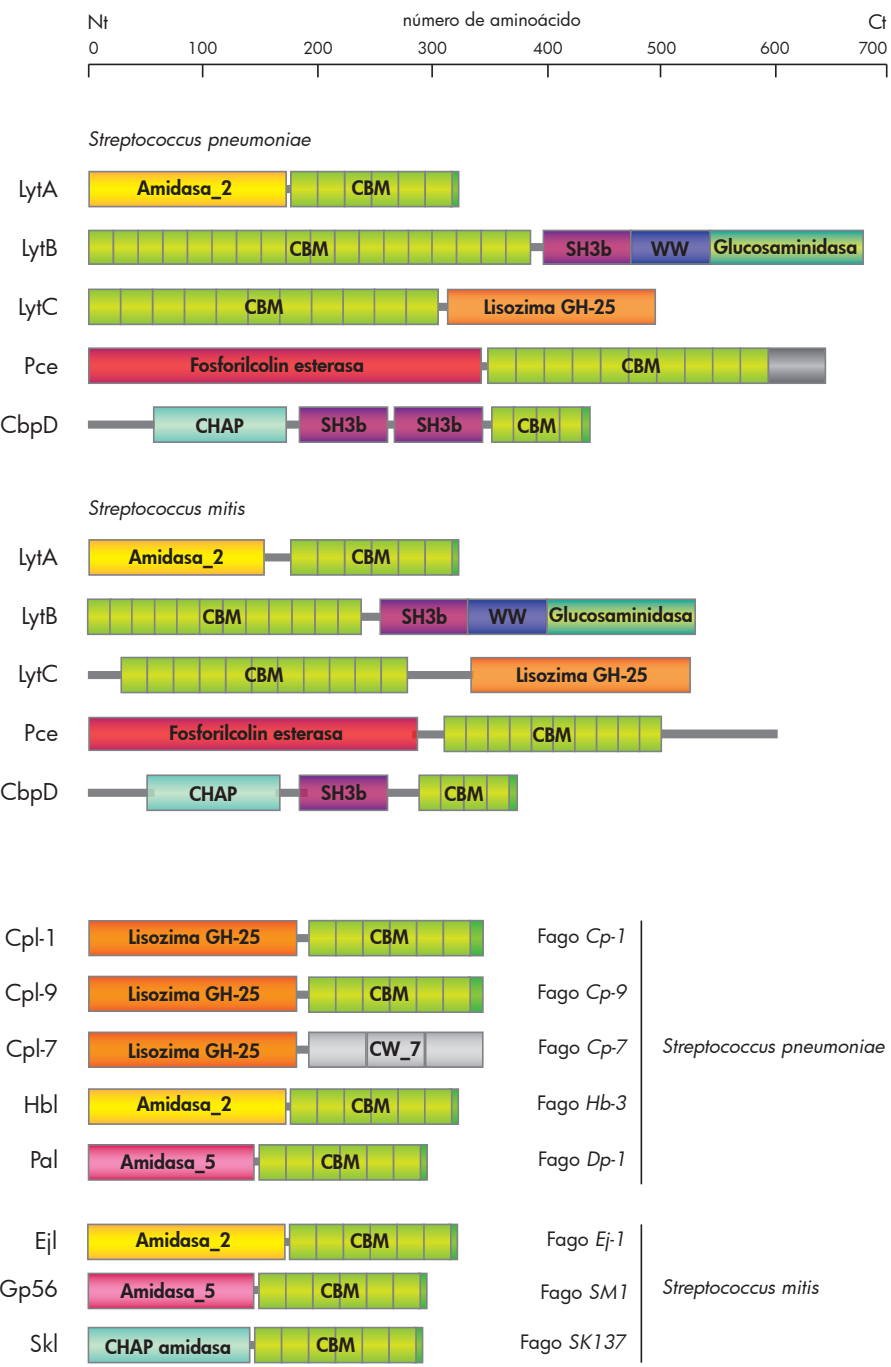
y, en algunos casos, en una misma enzima, varía de unas cepas a otras (Moscoso *et al.*, 2005). CbpD contiene, además, una o dos repeticiones SH3b que reconocen el peptidoglicano (Eldholm *et al.*, 2010), y están presentes también en la región catalítica de LytB junto con un dominio de tipo WW (Bai *et al.*, 2014).

Las PG hidrolasas dependientes de colina codificadas por neumococo y mitis muestran el mismo tipo de organización modular aunque, en mitis, el número de repeticiones del CBM de LytB es menor (Moscoso *et al.*, 2005) y CbpD contiene una sola repetición de tipo SH3b (**Figura 1.9**). Los módulos catalíticos, con cuatro tipos de actividades enzimáticas distintas, pertenecen a seis familias diferentes, incluidas las endolisinas codificadas por los fagos. El módulo catalítico de LytA, tanto en *S. pneumoniae* como en *S. mitis*, pertenece a la familia Amidasa_2 y es compartido por las endolisinas de fagos de neumococo (Hbl, del fago *Hb-3*) y mitis (Ejl, del fago *Ej-1*) cuyos CBMs contienen también el mismo número de repeticiones (Romero *et al.*, 2004). El módulo lisozima GH-25 de la autolisina LytC (neumococo y mitis) aparece también en varias endolisinas (Cpl-1, Cpl-9 y Cpl-7) de fagos, aunque LytC difiere tanto en la posición como en el número de repeticiones del CBM con respecto a las dos primeras, y en el tipo de repeticiones de unión a la pared celular con respecto a Cpl-7 (3 repeticiones CW_7). CbpD comparte un dominio catalítico de tipo CHAP (actividad cisteína-histidina amidohidrolasa/peptidasa) con la amidasa Skl del fago Φ SK137 de mitis, aunque el tipo de actividad específico de CbpD no ha sido establecido (Eldholm *et al.*, 2010; Llull *et al.*, 2006).

La similitud es también evidente entre las enzimas codificadas por sus respectivos fagos; así, la endolisina Gp56 codificada por Φ SM1 de mitis comparte con la amidasa Pal, producida por el fago Dp-1 de neumococo, tanto el tipo de módulo catalítico, Amidasa_5, como el número de repeticiones que conforman sus CBMs (Siboo *et al.*, 2003).

→

Figura 1.9. PG hidrolasas de *S. pneumoniae*, *S. mitis* y sus bacteriófagos. Representación esquemática de la organización modular de las PG hidrolasas de neumococo, sus equivalentes en mitis, y ejemplos representativos de las endolisinas codificadas por sus bacteriófagos. El tipo de actividad catalítica (amidasa o peptidasa) de CbpD no ha sido demostrado experimentalmente. La representación del módulo de unión a colina (CBM) refleja el número de repeticiones que lo forman y en los módulos catalíticos se indica el tipo de actividad y la familia a la que pertenecen. Los motivos CW_7, exclusivos de Cpl-7 en las endolisinas de los fagos de neumococo, reconocen, al igual que los motivos SH3b y WW, el PG de la bacteria.



Como ya se comentó en el **apartado 1.4**, la estrecha relación entre el profago y la bacteria hospedadora proporciona un ambiente ideal para que, sin afectar a la viabilidad del sistema, se produzcan intercambios de material genético que podrían dar lugar a la aparición de variantes de las enzimas líticas que reportaran ventajas evolutivas al fago, a la célula hospedadora o a ambos (López *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2010). La comparación de las secuencias de las PG hidrolasas codificadas por neumococo y sus bacteriófagos apoya la existencia de una coevolución (García *et al.*, 1988, 1990), y su estudio ha aportado una de las primeras evidencias experimentales a la teoría de la evolución modular de las proteínas (Sánchez-Puelles *et al.*, 1990; Sanz *et al.*, 1992, 1993; Usobiaga *et al.*, 1996), incluida la construcción de enzimas quiméricas entre distintos pares de enzimas, como la autolisina LytA y las endolisinas Cpl-1, Cpl-7 y Pal (Díaz *et al.*, 1990, 1991; Blázquez *et al.*, 2016), LytC y Cpl-1 (Pérez-Dorado *et al.*, 2010), o las endolisinas Cpl-1 y Cpl-7 (Díez-Martínez *et al.*, 2015). En todos los casos las proteínas construidas fueron activas y mostraban la especificidad de enlace y de sustrato correspondientes al módulo catalítico y al módulo de unión a la pared celular utilizados. Del mismo modo, la endolisina Pal puede considerarse una quimera natural originada por la fusión de dos genes, uno de origen desconocido que codifica el módulo catalítico y que se encuentra presente en fagos de *Lactococcus lactis* y *S. mitis* (Sheehan *et al.*, 1997; Siboo *et al.*, 2003), y otro que codifica el CBM presente en las otras amidasas.

1.6.1. Estructura de las CBPs

Hasta el momento se han resuelto las estructuras completas de cuatro CBPs con actividad PG hidrolasa: LytA, LytC, Pce y Cpl-1 (Li *et al.*, 2015; Pérez-Dorado *et al.*, 2010; Hermoso *et al.*, 2005, 2003), además de la región catalítica de LytB (Bai *et al.*, 2014) y una repetición CW_7 de Cpl-7 (PDB: 4CVD).

Cada una de las repeticiones que forman el CBM se pliega formando una horquilla- β (de unos 5 aminoácidos por hebra) seguida de un bucle que contiene un giro y una zona en conformación extendida y que enlaza con la siguiente repetición (**Figuras 1.10 y 1.11**). Las horquillas- β se disponen a su vez formando una superhélice a izquierdas, en la que la repetición (p_n) es paralela a la (p_{n+3}) y los sitios de unión a colina canónicos se sitúan en las interfaces hidrofóbicas creadas por tres residuos aromáticos procedentes de dos horquillas consecutivas (p_n y p_{n+1}), y un residuo hidrofóbico

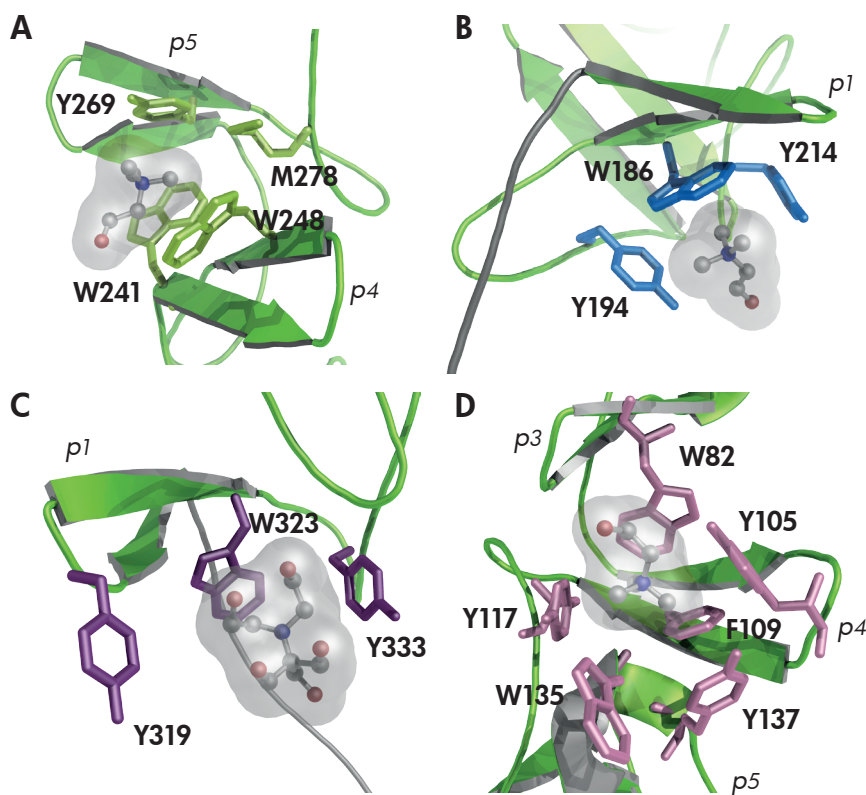


Figura 1.10. Tipos de sitios de unión a colina. (A) Sitio canónico de LytA situado entre la cuarta y la quinta repetición. (B) Sitio no canónico de LytA formado por residuos de la primera repetición. (Li *et al.*, 2015). (C) Sitio no canónico de Pce localizado entre la parte posterior del módulo catalítico y la primera repetición, ocupado por una molécula de Bis-Tris (Hermoso *et al.*, 2005). (D) Sitio de unión a colina de LytC formado por seis residuos aromáticos de tres repeticiones consecutivas (secuencias GYMA) (Pérez-Dorado *et al.*, 2010). Se muestran los residuos responsables de la unión de colina (representación de bastones), y las moléculas de colina (en Pce, Bis-Tris) en esferas y bastones y en superficie.

localizado en el bucle que une p_{n+1} y p_{n+2} (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003; **Figura 1.10 A**).

Además de estos sitios de unión a colina, se han identificado sitios de unión no canónicos en diversas CBPs. Tanto LytA (Li *et al.*, 2015; Mellroth *et al.*, 2014) como Pce (Hermoso *et al.*, 2005) tienen un sitio formado por dos residuos aromáticos de la primera repetición y un tercero procedente del conector de la segunda o la primera repetición, respectivamente (**Figura 1.10 B y C**).

En LytC (**Figura 1.10 D**) aparece un nuevo tipo de sitio de unión constituido por seis aminoácidos aromáticos procedentes de tres repeticiones consecutivas (p_n a p_{n+2}), lo que aumenta el tamaño de la cavidad. Presenta una secuencia característica (Gly-Tyr-Met-Ala, GYMA) al final de la repetición $i+2$, proponiéndose que los tres residuos aromáticos adicionales podrían interaccionar con el grupo fosfato de la P -Col o los anillos de GalNAc a los que se unen (Pérez-Dorado *et al.*, 2010).

Las estructuras de LytA y C-LytA cristalizadas corresponden al dímero estabilizado en presencia de colina (**Figura 1.11 A**) (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2015). El módulo catalítico, de tipo Amidasa_2, es un dominio globular que adopta el plegamiento típico de una N -acetil-muramoil-L-alanil amidasa dependiente de Zn, con una lámina central compuesta de siete hebras- β flanqueadas por seis hélices- α . Posee un átomo de Zn^{2+} coordinado octaédricamente en el centro activo (Li *et al.*, 2015). La dimerización de LytA, potenciada por la unión de colina (Usobiaga *et al.*, 1996), tiene lugar a través del extremo C-terminal. Los monómeros, dispuestos en un ángulo de unos 85° según el cristal de la proteína completa (PDB: 4X36; Li *et al.*, 2015), forman una estructura tipo bumerán, donde los módulos catalíticos se sitúan en los extremos del mismo, en posición trans uno respecto al otro (**Figura 1.11 A**). El ángulo de dimerización también es de 85° en la estructura de C-LytA de Fernández-Tornero *et al.* (2001) (PDB: 1HCX) y en la propuesta por Mellroth *et al.* (2014) (PDB: 4IWT) pero aumenta hasta 110° en la segunda estructura de C-LytA obtenida por Fernández-Tornero *et al.* (2002) (PDB: 1H8G), lo que podría sugerir una cierta flexibilidad entre los brazos del dímero, aunque no se ha podido confirmar mediante SAXS (Mellroth *et al.*, 2014).

LytC contiene un módulo catalítico lisozima perteneciente a la familia GH25 de las glicosil hidrolasas, con un plegamiento característico de tipo barril ($(\beta\alpha)_5\beta_3$) compuesto de ocho hebras flanqueadas por cinco hélices- α , que alberga el sitio catalítico (**Figura 1.11 B**). El CBM, compuesto de 11 repeticiones organizadas en dos dominios (NI: repeticiones $p1$ - $p9$ y NII: repeticiones $p10$ y $p11$), parece requerir de la unión de colina para su correcto plegamiento y estabilización como forma activa monomérica (Monterroso *et al.*, 2008).

El módulo catalítico de Pce está formado por un sándwich $\alpha\beta$ - $\beta\alpha$ (**Figura 1.11 C**), mientras que el CBM, formado por diez repeticiones y una

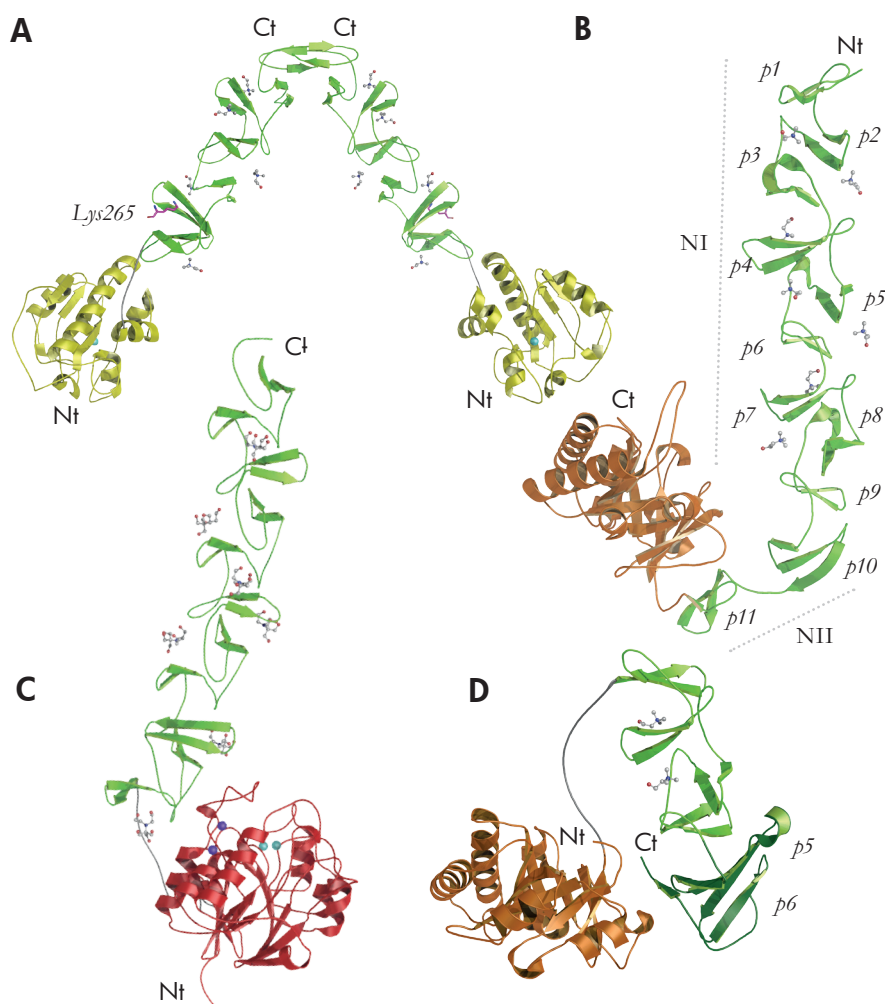


Figura 1.11. Estructuras 3D de CBPs con actividad hidrolasa. (A) Dímero de LytA formado a través de la última repetición y la horquilla- β C-terminal del CBM (PDB: 4X36, Li *et al.*, 2015); (B) LytC (PDB: 2WW5, Pérez-Dorado *et al.*, 2010); (C) Pce (PDB: 2BIB, Hermoso *et al.*, 2005); (D) Cpl-1 (PDB: 1OBA, Hermoso *et al.*, 2003). En verde: CBMs; amarillo: módulo catalítico tipo Amidasa_2; naranja: módulo lisozima de la familia GH25; rojo: módulo catalítico con actividad fosforilcolina esterasa. Los “linkers” se muestran en gris. Las moléculas de colina unidas a las formas cristalizadas se muestran mediante un modelo de esferas y varillas. En Pce los sitios de unión de colina están ocupados por moléculas de Bis-Tris (análogo estructural de la molécula de colina). El sitio 2 de LytA está ocupado por la Lys265 de un CBM adyacente (modelo de varillas en magenta). Las esferas en cian y morado representan, respectivamente, los átomos de cinc y calcio unidos a LytA y Pce. Nt y Ct indican los extremos N-terminal y C-terminal.

extensión C-terminal de función desconocida, presenta el plegamiento típico de la familia (Hermoso *et al.*, 2005).

En Cpl-1, cuyo módulo catalítico lisozima GH25 es análogo al de LytC, la estructura del CBM se desvía del plegamiento en superhélice característico de la familia (**Figura 1.11 D**). Aunque la estructura secundaria está conservada en todas las repeticiones, las dos últimas (*p5* y *p6*) y el extremo C-terminal (en verde más oscuro en la figura) se organizan formando una hoja- β antiparalela, cuya última hebra se encuentra insertada en una cavidad hidrofóbica entre el CBM y el módulo catalítico (Hermoso *et al.*, 2003). Este cambio en el plegamiento global hace que el número de sitios canónicos funcionales en Cpl-1 sea menor que el número de posibles sitios basado en la secuencia.

Algunas enzimas con CBM experimentan el denominado fenómeno de la conversión: presentan una forma C completamente activa en presencia de colina o paredes portadoras de la misma, y una forma E de baja actividad cuando no han sido expuestas a la acción de colina, o tras diálisis en ausencia de la misma. Sin embargo, LytA sólo presenta la forma C una vez que ha sido expuesta a un entorno con colina, no pudiendo recuperarse la forma E con diálisis. Este hecho se ha relacionado con los aminoácidos de la última repetición, en concreto la Val317, aunque la Tyr294 y la Leu314 también parecen estar implicadas, en menor medida, en este fenómeno (Romero *et al.*, 2004, 2007). Las CBPs cuyo penúltimo aminoácido no es valina son susceptibles a la conversión reversible y pérdida parcial de actividad, que recuperan incubándose 5 min a 4°C en presencia de colina o paredes que la contengan (Díaz *et al.*, 1992) sin que aún hayan sido desvelados los cambios estructurales, posiblemente sutiles, que provocan este comportamiento.

Todo lo expuesto pone de manifiesto la enorme versatilidad de los CBMs que, además de actuar como receptores de colina, son capaces de mediar las interacciones entre dominios y la dimerización de determinadas CBPs (Buey *et al.*, 2007; Hermoso *et al.*, 2003, 2005; Usobiaga *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2000).

1.6.2. Skl, una amidasa dependiente de colina codificada por el profago Φ SK137 de *S. mitis*

El fago Φ SK137 de *Streptococcus mitis* codifica para una PG hidrolasa, Skl (288 aa, 33.377 Da) con actividad *N*-acetilmuramoil-L-alanil amidasa (EC 3.5.1.28) (Llull *et al.*, 2006). Experimentos previos muestran que Skl es capaz de hidrolizar tanto paredes de *S. mitis* como de *S. pneumoniae*, siendo su actividad óptima a pH 6,5 y 30°C. Se ha sugerido también que la presencia de cationes divalentes puede ser un factor determinante para la estabilidad y/o la actividad (Llull *et al.*, 2006). Atendiendo a su secuencia, Skl contiene en posición C-terminal un CBM formado por seis repeticiones seguidas de un segmento de 15 aminoácidos en el extremo C-terminal (**Figura 1.9**), estrechamente relacionados en secuencia con el CBM de LytA (64% identidad; 88% similitud). Skl consta, además, de un módulo catalítico, situado en posición N-terminal, perteneciente a la familia CHAP (Pfam: PF05257).

La familia CHAP es una de las 65 familias que conforman el clan CA de las peptidasas. Los dominios de tipo CHAP están formados por entre 110 y 140 aminoácidos y están presentes en proteínas de bacterias, bacteriófagos, arqueas (Archaea) y eucariotas de la familia Trypanosomidae (Rigden *et al.*, 2003). Muchas de las proteínas de tipo CHAP están aún sin caracterizar, pero se ha propuesto que podrían actuar principalmente en la hidrólisis del PG. Están incluidas en la familia estructural alfa + beta donde, según las predicciones previas de estructura secundaria, el extremo N-terminal estaría formado por hélices- α y el C-terminal, por hebras- β . Durante el desarrollo de este trabajo se han publicado las estructuras tridimensionales de diversos dominios CHAP (Bartual *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2014; McGowan *et al.*, 2012; Pai *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2009; Sanz-Gaitero *et al.*, 2014) que muestran una topología típica del clan CA o tipo papaína $\alpha\alpha\beta\beta\beta\beta\alpha\beta$ (Barrett & Rawlings, 1996; Kamphuis *et al.*, 1984) compuesta de una lámina β en forma de silla, con dos o tres hélices- α flanqueantes (**Figura 1.12**). La estructura muestra un bolsillo hidrofóbico entre dos de las hebras- β y una de las hélices, donde se localizan los aminoácidos catalíticos. Todos ellos contienen una cisteína, situada al comienzo de una hélice- α , y una histidina, en el inicio de una hebra- β , que forman parte del sitio activo, habiéndose sugerido que la cisteína catalítica actuaría según un mecanismo de ataque nucleofílico (Bateman & Rawlings, 2003; Rigden *et al.*, 2003). En algunas de las estructuras publicadas se ha

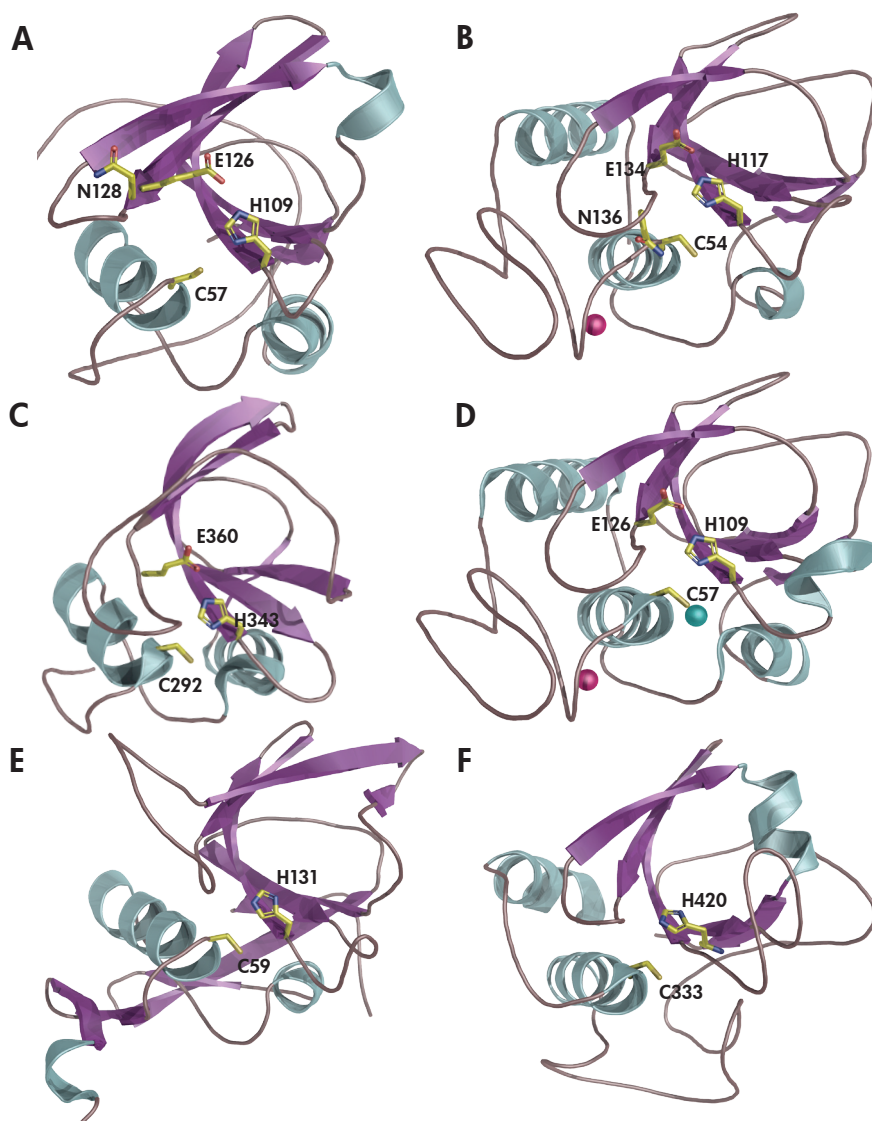


Figura 1.12. Estructuras 3D de dominios CHAP. (A) Proteína secretada SSP0609 de *Staphylococcus saprophyticus* (PDB: 2K3A, Rossi *et al.*, 2009); (B) lisina LysGH15 del fago GH15 de estafilococos (PDB: 4OLK, Gu *et al.*, 2014); (C) proteína PcsB de *Streptococcus pneumoniae* (PDB: 4CGK, Bartual *et al.*, 2014); (D) dominio CHAP_K de la endolisina LysK del bacteriófago K de *Staphylococcus aureus* (PDB: 4CSH, Sanz-Gaitero *et al.*, 2014); (E) dominio amidasa de la proteína bifuncional glutatiónil espermidina sintetasa/amidasa (GspS) de *Escherichia coli* (PDB: 2IO8, Pai *et al.*, 2006); (F) lisina PlyC, originaria de un fago de estreptococos (PDB: 4F88, McGowan *et al.*, 2012). Los residuos catalíticos invariables (Cys e His en todas las estructuras) así como los considerados con implicación en la catálisis se muestran mediante modelo de bastones. Las esferas en cian y magenta representan, respectivamente, átomos de cinc y calcio.

propuesto y/o estudiado además la implicación en la catálisis, mediante estabilización por transferencia de carga, de un tercer e incluso un cuarto residuo polar (Rossi *et al.*, 2009).

1.7. Aplicaciones biomédicas de fagos y PG hidrolasas líticas: terapia fágica y enzibióticos

La capacidad de los bacteriófagos para lisar a sus bacterias hospedadoras, su gran diversidad y su elevada especificidad hicieron que, poco después de su descubrimiento, se propusieran como herramientas de control de la población bacteriana (D'Herelle, 1931). La terapia fágica se convirtió de hecho, durante años, en una práctica común en Estados Unidos y la antigua Unión Soviética (Summers, 2012). El escaso conocimiento de la biología de los fagos y el desarrollo de los antibióticos en los años 50, unidos a otros factores políticos y culturales, hicieron que el uso de esta estrategia se relegara progresivamente tanto en Europa occidental como en EEUU (Summers, 2001), aunque el Instituto Eliava de Tiflis (Georgia), fundado por Felix d'Herelle y George Eliava (Hanlon, 2007), ha seguido desarrollando técnicas para la obtención y selección de bacteriófagos utilizados contra diversas infecciones bacterianas (Abedon *et al.*, 2011; Chanishvili, 2012). A partir de los años 80 y 90, y como consecuencia de la creciente aparición de resistencias a los antibióticos, surgió un interés renovado en el empleo de la terapia fágica no solo en medicina, sino como método de control y/o eliminación de patógenos en productos de consumo humano (Monk *et al.*, 2010; Sharma, 2013), debido fundamentalmente a:

- la especificidad de los fagos hacia la bacteria hospedadora
- su capacidad de matar bacterias sin contribuir a la aparición de resistencias
- el bajo coste y la simplicidad de su producción
- su seguridad para el ser humano, los animales y el medio ambiente (Hanlon, 2007).

A todas estas ventajas se suman también *i)* el hecho de que la carga fágica inicial se multiplique exponencialmente tras alcanzar el objetivo, *ii)* la capacidad de los bacteriófagos para atravesar la barrera hemato-encefálica

(Alisky *et al.*, 1998), y *iii*) su capacidad de adaptación a la evolución de las bacterias hacia formas resistentes a los antibióticos. Los potenciales inconvenientes derivan principalmente de una adecuada selección de los fagos que, además de ser fagos de tipo virulento y no codificar ningún factor de virulencia o toxina, deberían ser relativamente fáciles de producir a gran escala y permanecer estables bajo condiciones estándar de almacenamiento y temperatura (Brussow, 2005; Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

Una variante de la terapia fágica es la utilización de productos aislados de los bacteriófagos para el tratamiento o la prevención de las infecciones bacterianas, como es el caso de los denominados enzibióticos. Este término, un híbrido de las palabras “enzima” y “antibiótico”, fue utilizado por primera vez por Nelson *et al.* (2001) para designar a las endolisinas codificadas por bacteriófagos - o a las autolisinas bacterianas- capaces de inducir, desde el exterior, la lisis bacteriana de forma rápida y específica, actuando como agentes antibacterianos. Más ampliamente, se ha sugerido que en la definición de enzibiótico deberían incluirse todas aquellas enzimas que muestren actividad antibacteriana y/o antifúngica (Biziulevicius *et al.*, 2008; Veiga-Crespo *et al.*, 2007). Sus posibles aplicaciones incluyen desde el tratamiento/prevención de infecciones (Gu *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2001) o la detección de bacterias en pacientes (Bernstein & Fischetti, 1997), hasta la descontaminación de material médico y la preservación de alimentos, bebidas y otros productos (Oliveira *et al.*, 2015; Schmelcher *et al.*, 2015; Trudil, 2015).

El uso de las enzimas líticas supone una novedosa alternativa a los antibióticos clásicos puesto que utilizan un nuevo mecanismo de acción terapéutica (la hidrólisis de la pared celular bacteriana), actúan sobre un rango único o muy limitado de especies bacterianas y, por tanto, preservan la microflora normal (Loeffler *et al.*, 2001; Fischetti, 2008). Además, la probabilidad de generar resistencias es baja, posiblemente por actuar sobre un elemento esencial para la viabilidad de la bacteria como es el PG (Borysowski & Górski, 2009).

Los enzibióticos son capaces de eliminar bacterias a nivel profiláctico y en infecciones sistémicas o localizadas, como se ha demostrado con modelos animales de sepsis, endocarditis, neumonía o meningitis, y también tópicamente, en descolonización de piel y mucosas (McCullers *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2002; Pastagia *et al.*, 2011). Como proteínas, las lisisinas son potencialmente antigénicas. Debido a ello, podrían suponer un

problema a la hora de su administración y uso como enzibióticos, tanto por posibles reacciones inflamatorias como por su eliminación o inutilización por parte de los anticuerpos del sistema inmune, disminuyendo así su eficacia. Sin embargo, los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados hasta el momento muestran que los anticuerpos generados no son neutralizantes (Pastagia *et al.*, 2013). La liberación de fragmentos de la pared bacteriana podría también inducir un aumento en la producción de citoquinas y en la respuesta inflamatoria por parte del hospedador. Las diferencias de comportamiento observadas según el modelo de infección utilizado (Doehn *et al.*, 2013; Entenza *et al.*, 2005; Witzenrath *et al.*, 2009) hacen necesarios más estudios para evaluar la posible respuesta, si bien publicaciones recientes parecen inclinarse hacia su viabilidad y ausencia de efectos adversos: los experimentos con LysGH15 muestran que, en ratones, es capaz de eliminar MRSA y que, aunque se activa la respuesta inmune humoral, sigue siendo capaz de actuar eficazmente sin verse afectada por la acción de los anticuerpos ni inducir inflamación (Zhang *et al.*, 2016).

1.7.1. Lisinas de diseño

La gran especificidad de las lisinas codificadas por Gram-positivos y sus fagos está directamente relacionada con su organización modular, es decir, con la incorporación a sus secuencias de dominios catalíticos junto a dominios de unión a la pared celular, que reconocen elementos de la misma específicos del género o la especie, y a veces, incluso de la cepa (Briers *et al.*, 2014; Farkasovská *et al.*, 2003; Loessner *et al.*, 2002; López & García, 2004; Vollmer, 2008). Esta organización modular, y el hecho de que los dominios estén conectados por cortos segmentos peptídicos, facilitan el intercambio y/o la adición de módulos. Por otro lado, al actuar desde el exterior de la bacteria, las diferencias en la composición y distribución de cargas de la pared o la cápsula, o en la propia superficie de la lisina, pueden ser relevantes tanto para la eficacia catalítica como para la especificidad de sustrato (Díez-Martínez *et al.*, 2013, 2015; Low *et al.*, 2011).

En el caso de las bacterias Gram-negativas, la utilización de las lisinas como enzibióticos requiere el desarrollo de estrategias adicionales que faciliten su acceso al PG, dificultado por la presencia de la membrana externa y el lipopolisacárido asociado a la misma. En general, en Gram-negativas, son proteínas típicamente globulares, aunque se han identificado algunas estructuras modulares (Gerstmanns *et al.*, 2016). Algunas endolisinas tienen una capacidad bactericida innata frente a es-

pecies Gram-negativas, atribuida a la presencia de un dominio N- o C-terminal que interfiere con la capa negativamente cargada del lipopolisacárido (Lai *et al.*, 2011; Lood *et al.*, 2015). La fusión, en las denominadas artilisinas, de un péptido desestabilizador del lipopolisacárido asociado a la membrana externa (Briers *et al.*, 2014), la combinación con un transportador de la membrana externa (Lukacik *et al.*, 2012), o la utilización de agentes capaces de perturbar la estructura de la misma (Briers *et al.*, 2011; Díez-Martínez *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Walmagh *et al.*, 2013) son algunas de las posibilidades exploradas hasta el momento. Recientemente se ha demostrado la capacidad de ciertos péptidos cargados, relacionados en secuencia con el extremo C-terminal de la lisina fágica PlyF307, para actuar sobre Gram-negativos (*Acinetobacter baumannii*), llegando a la práctica esterilización de los cultivos (Thandar *et al.*, 2016).

Es por todo esto que, aparte del interés en las lisinas naturales, existe un interés creciente en las lisinas “de diseño” creadas a partir de modificaciones de las formas silvestres (por intercambio o adición de módulos, modificación de cargas, inserción de péptidos cargados, etc.), para obtener actividades, estabildades o biodisponibilidades mejoradas (Briers *et al.*, 2007; Díez-Martínez *et al.*, 2013, 2015; Farkasovská *et al.*, 2003; Fenton *et al.*, 2010; Loessner *et al.*, 2002; Pastagia *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014a) o, según el objetivo, con mayor o menor espectro de acción (Díez-Martínez *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014b).

En el caso de neumococo, tanto su principal autolisina LytA, como las lisinas fágicas Cpl-1 y Pal, han demostrado su capacidad para actuar como enzibióticos en diversos modelos animales de colonización o infección (sepsis, endocarditis o neumonía) por neumococo y otras bacterias que contienen colina en sus TAs, sin afectar a la microbiota normal (Jado *et al.*, 2003; Loeffler & Fischetti, 2003; Loeffler *et al.*, 2001, 2003; Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007a). Pueden actuar de forma sinérgica cuando se administran conjuntamente (Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007b), o en combinación con ciertos antibióticos (Djurkovic *et al.*, 2005; Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007b; Vouillamoz *et al.*, 2013), incluso frente a cepas resistentes a penicilina (Jado *et al.*, 2003; Loeffler & Fischetti, 2003). LytA y las endolisinas Cpl-1 y Cpl-7 destruyen también de forma eficiente los biofilms de neumococo, un tipo de comunidad microbiana relacionada con el 80 % de las infecciones crónicas (Domenech *et al.*, 2011).

La construcción de quimeras por intercambio de los distintos módulos de Cpl-1 y Cpl-7, por un lado, y del dominio catalítico de Pal y el CBM de LytA por otro, ha permitido, asimismo, obtener dos nuevos enzibióticos, Cpl-711 y PL3, cuya actividad supera a la de todos los enzibióticos testados hasta el momento frente a neumococo (Díez-Martínez *et al.*, 2015; Blázquez *et al.*, 2016). Cpl-7, cuyo módulo de unión a la pared celular reconoce el PG (Bustamante *et al.*, 2012), es activa contra neumococo y otros patógenos Gram-positivos como *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* o *S. mitis*, e incluso Gram-negativos, y su eficacia como antibacteriano se incrementó de forma notable invirtiendo, de negativa a positiva, la carga neta del módulo de unión a la pared (Díez-Martínez *et al.*, 2013).

La ingeniería de lisinas constituye, por tanto, un campo prometedor para crear nuevos enzibióticos y ofrece grandes posibilidades en la lucha contra las infecciones bacterianas, especialmente las provocadas por cepas multirresistentes. En este contexto, Skl es el primer ejemplo de un nuevo tipo de CBP con actividad amidasa mediada por un dominio CHAP y una posible diana en la búsqueda de nuevos enzibióticos frente a *S. pneumoniae*, *S. mitis* y otros patógenos Gram-positivos cuya envuelta celular contenga colina.

OBJETIVOS

2

OBJETIVOS

El potencial de las lisinas de *S. pneumoniae* y especies relacionadas, así como las de los fagos que las infectan, para actuar como antibacterianos y proteger contra las infecciones provocadas por estas bacterias nos ha llevado a caracterizar la endolisina Skl, codificada por el fago Φ SK137 de *S. mitis*, investigando el papel de sus módulos en la actividad antibacteriana, así como la posibilidad de generar enzimas quiméricas más activas que Skl.

Los objetivos iniciales específicos del estudio de Skl fueron:

1. Caracterización espectroscópica y calorimétrica de la estructura y estabilidad de Skl, así como de su organización modular, en ausencia y en presencia de colina.
2. Modelización de Skl a baja y alta resolución, en ausencia y en presencia de colina.
3. Identificación de los residuos catalíticos o relevantes para la catálisis.
4. Estudio de la actividad bacteriolítica y bactericida de Skl.

OBJETIVOS

Las diferencias encontradas en la afinidad por colina de Skl en comparación con la de LytA, la autolisina mayoritaria de neumococo, y su posible relación con las diferencias observadas en su actividad sobre bacterias, condujeron el estudio a la construcción de enzimas quiméricas por intercambio de sus módulos, y así explorar la posibilidad de obtener enzimas con actividades mejoradas respecto a las enzimas parentales.

Los objetivos planteados tras el estudio inicial de Skl fueron:

5. Diseño y construcción de las enzimas quiméricas QLAS1 y QSLA2 por intercambio de módulos entre las amidasas Skl y LytA.
6. Caracterización espectroscópica y calorimétrica de la estructura y estabilidad de las enzimas quiméricas y de su organización modular, en ausencia y en presencia de colina.
7. Evaluación de la actividad bacteriolítica y bactericida de las quimeras.
8. Ensayos de actividad *in vivo* en un modelo animal de infección

MATERIALES Y MÉTODOS

3

MATERIALES Y MÉTODOS

3

3.1. Materiales

3.1.1. Estirpes bacterianas y medios de cultivo

Las cepas bacterianas empleadas y sus características se enumeran en la **Tabla 3.1**.

Las células de *E. coli* utilizadas se crecieron en medio líquido LB (Lysogenic Broth) (Bertani, 1951), excepto en la preparación de las células DH10B electrocompetentes, que se cultivaron en medio SuperBroth (triptona 30 g/l, extracto de levadura 20 g/l, MOPS 10 g/l). Las cepas de *S. pneumoniae* se cultivaron a 37°C en medio líquido semisintético C ajustado a pH 8 (CpH8) suplementado con extracto de levadura al 0,08 % (p/v) (C + Y) (Lacks & Hotchkiss, 1960), excepto las cepas D48 y 69 (19F) que se crecieron en medio Todd-Hewitt suplementado con 0,5 % (p/v) de extracto de levadura (TH + Y). Los cultivos de *S. mitis* en medio líquido se crecieron en medio C + Y a 37°C.

Tabla 3.1. Estirpes bacterianas

Cepa	Características	Origen/Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL endA1 nupG</i>	CIB
BL21 (DE3)	F' <i>ompT gal[cdm]</i> [<i>lon</i>] <i>hsdS_B</i> con DE3 Cepa con el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo control del promotor LacUV5 en el DNA cromosómico	Studier & Moffatt, 1986
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
R6	Cepa de laboratorio no capsulada, derivada del aislado clínico D39	Hoskins <i>et al.</i> , 2001
D39	Cepa capsulada serotipo 2	Lanie <i>et al.</i> , 2007
P007	Cepa M11, derivada de R6, transformada con DNA cromosómico del serotipo capsular 3	Domenech <i>et al.</i> , 2009
P008	Cepa derivada de P007 con DNA de serotipo capsular 4	Moscoso <i>et al.</i> , 2006
69	Cepa multirresistente (tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol y amoxicilina), serotipo 19F	Ramos-Sevillano <i>et al.</i> , 2012
48	Cepa multirresistente (eritromicina, azitromicina, tetraciclina, etc.), serotipo 23F	Ramos-Sevillano <i>et al.</i> , 2012
ATCC®49619™ a	Cepa tipo para ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos, serotipo 19F	https://www. lgcstandards-atcc.org/ Products/All/49619. aspx

Tabla 3.1. Estirpes bacterianas (continuación)

Cepa	Características	Origen/Referencia
<i>Streptococcus mitis</i>		
B6	Cepa multiresistente (tetraciclina, gentamicina, β -lactámicos, etc.) lisogénica para Φ B6	Denapaite <i>et al.</i> , 2010; König <i>et al.</i> , 1998
SKL137	Cepa lisogénica para Φ SK137, (codificante de la endolisina Skl)	Llull <i>et al.</i> , 2006

^aATCC[®]: American Type Culture Collection.

El cultivo en medio sólido de neumococo y *S. mitis* se llevó a cabo en placas de agar de soja tripticaseína conteniendo un 5 % de sangre desfibrinada de carnero. Para *E. coli* las placas fueron de LB con agar al 1,5 % (p/v).

La selección de bacterias de *E. coli* transformadas con plásmidos se realizó añadiendo ampicilina (100 μ g/ml) al medio.

En la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se usó medio Mueller-Hinton II ajustado en cationes, suplementado con sangre lisada de caballo al 3,5 % (v/v) (CA-MHB-LHB).

Todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión. Los antibióticos se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles de 0,2 μ m de diámetro de poro y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.1.2. Plásmidos y oligonucleótidos

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en las **Tablas 3.2 y 3.3**.

Tabla 3.2. Plásmidos

Nombre	Descripción	Origen/ Referencia
pGEM-T	Vector de clonación (Amp ^R) ^a	Promega
pT7-7	Vector de expresión con promotores T7 y Sp6 (Amp ^R)	Tabor, 2001
pFSK6	Plásmido derivado de pIN-III (<i>pp'</i> -5)-A3 que sobreexpresa Skl silvestre (Amp ^R)	Llull <i>et al.</i> , 2006
pGL100	Plásmido recombinante derivado de pIN-III-A3 que sobreexpresa LytA (Amp ^R)	García <i>et al.</i> , 1987
pLAskI	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreexpresa QLAS1	Este trabajo
pSkIIA	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreexpresa QSLA2	Este trabajo
pUC-Skl-C31A	Plásmido derivado de pUC que alberga el gen mutante C31A de Skl	ATG biosynthetics
pUC-Skl-H92A	Plásmido derivado de pUC que alberga el gen mutante H92A de Skl	ATG biosynthetics
pUC-Skl-E109A	Plásmido derivado de pUC que alberga el gen mutante E109A de Skl	ATG biosynthetics
pSkl-C31A	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreexpresa el mutante C31A de Skl	Este trabajo
pSkl-H92A	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreexpresa el mutante H92A de Skl	Este trabajo
pSkl-E109A	Plásmido derivado de pT7-7 que sobreexpresa el mutante E109A de Skl	Este trabajo

^a Amp^R: resistencia a ampicilina

Tabla 3.3. Oligonucleótidos empleados como cebadores

Nombre	Secuencia (5' → 3') ^a	Uso
LA 5' NdeI	GATAAGGAGTAGCATATGGAAATTAA TGTG	5' N-LytA PCR quimeras
LA-Skl <i>rev</i>	GGGTAAGAGCCATCTTCACGAACGTA CCAGTAGCCAGTGTCAATTCTTC	3' N-LytA PCR quimeras
LA-Skl <i>for</i>	GAAGAATGACACTGGCTACTGGTACG TTCGTGAAGATGGCTCTTACCC	5' C-Skl PCR quimeras
Skl 3' BamHI	AAGGATCCTATTTTCGTAGTAATCAAG CCTTC	3' C-Skl PCR quimeras
Skl 5' NdeI	GAGGAATACATATGTCTAAAAACAG GAAATG	5' N-Skl PCR quimeras
Skl-LA <i>rev</i>	CTTTTGGATAAGAGCCGTCTGAATGA ACCCACCACCAACCATACTG	3' N-Skl PCR quimeras
Skl-LA <i>for</i>	CAGTATGGTTGGTGGTGGGTTCAATTC AGACGGCTCTTATCCAAAAG	5' C-LytA PCR quimeras
LA 3' ext long HindIII	GCATACTATTAAGCTTTTCAAGACC TA	3' C-LytA PCR quimeras
F24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Secuenciación de insertos en pGEMT'
R24	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	"
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación de insertos en pT7-7
pT7 3'	CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC	"

^a En rojo y verde se indican regiones que codifican para LytA o Skl, respectivamente, y en azul las modificaciones introducidas para realizar las hibridaciones (ver **Figura 3.1**). Las secuencias utilizadas para introducir los sitios de corte necesarios (BamHI, NdeI y HindIII) para trasladar los fragmentos al vector de expresión se han subrayado.

3.1.3. Reactivos químicos y herramientas informáticas

Los proveedores de los reactivos químicos utilizados y las herramientas informáticas utilizadas en este trabajo se enumeran en el Anexo, **Tabla 8.1** y **Tabla 8.2**, respectivamente.

3.2. Métodos

3.2.1. Crecimiento y conservación de cepas bacterianas

Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se crecieron con aireación y agitación en matraces con un volumen cinco veces superior al del medio de cultivo, mientras que las células de *S. pneumoniae* y *S. mitis* se crecieron en baños sin agitación utilizando tubos con una capacidad inferior al doble del volumen del cultivo. El crecimiento en medio sólido fue en superficie y las placas se incubaron en estufa durante 18-24 horas con 5% de CO₂ y sin agitación. La temperatura de incubación fue 37 °C para todas las estirpes, tanto en medio líquido como en placa.

El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría a 600 nm (DO₆₀₀) en *E. coli* y a 550 nm (DO₅₅₀) en *S. pneumoniae* y *S. mitis* utilizando un espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios Epsilon. Las DO alcanzadas fueron de 0,6 para los cultivos de *E. coli* (excepto las células electrocompetentes que se crecieron hasta una DO de 0,8–0,9) y de $\approx 0,3$ para los cultivos de *S. pneumoniae* y *S. mitis*, lo que equivaldría a $\approx 1 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias/ml (CFU/ml) en el caso de los estreptococos (Slotved & Satzke, 2013). Para la determinación de la CMI se crecieron células de *S. pneumoniae* en placas de agar-sangre, según las condiciones arriba indicadas, para después preparar una suspensión de las mismas en 3 ml de medio CA-MHB-LHB hasta una DO₆₀₀ de $\approx 0,35$.

Las cepas se conservaron congeladas a -80 °C en sus respectivos medios de cultivo, a los que se añadió glicerol hasta una concentración final del 10% (v/v), utilizando suspensiones de bacterias en fase exponencial. Se emplearon subcultivos frescos para cada nuevo experimento.

3.2.2. Transformación genética

3.2.2.a. Transformación por choque térmico

La transformación de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) se llevó a cabo por choque térmico según el método descrito en “Molecular

Cloning: a laboratory manual” (Sambrook & Russell, 2001). Sobre 200 μ l de bacterias competentes se añadió el DNA transformante (0,1 a 0,2 μ g) y se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo, posteriormente 3 minutos a 37°C y finalmente 5 minutos en hielo. Después se añadieron 0,8 ml de LB, dejando expresar la resistencia al antibiótico (ampicilina) durante 1 hora a 37 °C y, posteriormente, se sembraron las células en placas de LB + antibiótico, incubándose éstas toda la noche en estufa a 37°C.

3.2.2.b. Transformación por electroporación

Las células de *E. coli* DH10B electrocompetentes se transformaron por electroporación según el método previamente descrito (Dower *et al.*, 1988). El material empleado se enfrió a 4°C y se añadieron 10 μ l de DNA transformante (previamente precipitado con 500 μ l de butanol, centrifugado a 4°C, 15 min a 13.000 rpm, secado y resuspendido en agua milli-Q estéril para eliminar sales) sobre 100 μ l de células. La electroporación se realizó en un equipo Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad) en las siguientes condiciones: resistencia 200 Ω , voltaje 2,5 kV, capacitancia 25 μ Fa. Inmediatamente después se añadió 1 ml de LB y se incubaron las células a 37°C durante 1 hora para, posteriormente, sembrarlas en placas de LB + ampicilina.

3.2.3. Técnicas de DNA

Las técnicas empleadas en la manipulación del DNA en este trabajo están esencialmente descritas en “Molecular Cloning: a laboratory manual” (Sambrook & Russell, 2001).

3.2.3.a. Extracción y purificación de DNA

La extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli*, obtenidos inoculando la cepa correspondiente en 5 ml de medio LB (con el antibiótico requerido) e incubando a 37°C en agitación durante 12- 16 h hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1,5- 5. La extracción se hizo siguiendo el protocolo de los kits comerciales “High Pure plasmid Isolation Kit” de Roche o “Quantum Prep® Plasmid Kit” de Bio Rad. La concentración de DNA en las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (DO₂₆₀) en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando para la cuantificación una absorbancia de 20 DO para una solución de DNA de 1 mg/ml y un paso óptico de 1 cm.

3.2.3.b. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis de DNA se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa al 0,7 o 1,5 % en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,1), utilizando el mismo tampón para el desarrollo de la electroforesis. A las muestras se les añadió $\frac{1}{4}$ de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30 % (p/v), azul de bromofenol al 0,2 % (p/v), xilencianol al 0,2 % y EDTA 40 mM (pH 8,0). La electroforesis se realizó a 100 - 150 V durante 60 - 90 minutos y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con GelRed™ durante 20 minutos (30 μ l GelRed™ + 2 ml NaCl 5M + 98 ml H₂O). Los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta. Según los casos, se utilizó como marcador de tamaño molecular el DNA del fago λ digerido con BstEII o la forma replicativa del DNA del fago Φ X174 digerida con HaeIII.

Los fragmentos de DNA de interés se extrajeron recortando las bandas de los geles de agarosa y se aislaron con el “GeneClean Turbo kit”.

3.2.3.c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) y se utilizaron las DNA polimerasas *Pfu* o *Taq* de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los productos amplificados se purificaron utilizando el sistema “High Pure™ PCR Product purification Kit”.

3.2.3.d. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el servicio de secuenciación (Secugen) del Centro de Investigaciones Biológicas, utilizando un secuenciador automático modelo Abi Prism 3700™ (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación utilizaron el kit “Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa AmpliTaq Fs, siguiendo las recomendaciones de los suministradores.

3.2.3.e. Manipulación del DNA con enzimas de uso común en Biología Molecular

Las enzimas de restricción, la DNA ligasa del fago T4 y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo, en cada caso, las indicaciones recomendadas por las respectivas casas comerciales.

En general, la digestión con enzimas de restricción se realizó en un volumen final de 20 - 30 μ l con la siguiente composición: 1 μ g de vector a digerir, 10 % del volumen total de BSA, la mínima cantidad de enzima

necesaria (una unidad de enzima digiere un μg de DNA en una hora), el 10 % del volumen final de su tampón correspondiente y H_2O hasta el volumen final deseado. Se dejaron actuar alrededor de 2-4 h a 37°C . Las enzimas se inactivaron a 65°C durante 10 min.

La ligación de fragmentos lineales de DNA se llevó a cabo utilizando relaciones inserto/vector comprendidas entre 1:5 y 1:20 en un volumen final de unos 20 μl , con 1 μl de ligasa por cada 10 μl de mezcla de ligación, con su correspondiente tampón, 10 % del volumen total de BSA al 0,1 % (p/v) y H_2O hasta el volumen final deseado. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 120-180 minutos o durante toda la noche a 16°C .

3.2.4. Construcción y clonación de genes en cepas hiperproductoras

3.2.4.a. Construcción de genes quiméricos

El procedimiento empleado para la obtención de las quimeras QLAS1 y QSLA2, basado en el método de extensión de fragmentos solapantes mediante PCRs (Wurch *et al.*, 1998), consiste en tres PCRs (cuyos detalles se muestran en el esquema de la **Figura 3.1**). En el primer paso (PCR1 y PCR2 en la **Figura 3.1**) se amplifican por separado las secuencias de cada uno de los módulos que conformarán la quimera utilizando como moldes las secuencias completas de *LytA* o *Skl*, clonadas previamente en plásmidos (**Tabla 3.2**), y los cebadores diseñados al efecto (**Tabla 3.3**), en los que se incluyen las secuencias señal para las enzimas de restricción (*NdeI* y *BamHI* para QLAS1, y *NdeI* y *HindIII* para QSLA2). Las secuencias “*for*” y “*rev*” son idénticas al molde pero contienen una extensión que las hace complementarias entre sí, lo que hace posible, en una segunda etapa previa a la PCR3, que los fragmentos amplificados puedan hibridar por dichos extremos y completarse las secuencias. A continuación, se lleva a cabo la PCR3, añadiendo los cebadores correspondientes para amplificar el producto de la etapa anterior, con lo que se obtiene como resultado final el gen quimérico.

En todas estas PCRs se empleó la DNA polimerasa *Pfu*, por su baja tasa de error. Las condiciones experimentales utilizadas se detallan en las **Tablas 3.4** y **3.5**. Las secuencias completas de cada quimera se pueden encontrar en el Anexo (**Tablas 8.3** y **8.4**).

Tabla 3.4. Condiciones de las PCRs para la construcción de los genes quiméricos

	QLAS1			QSLA2		
	T (°C)	tiempo	n° ciclos	T (°C)	tiempo	n° ciclos
PCR 1 y 2						
Activación	94	5 min	1	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	30	94	30 s	30
Hibridación ^a	55	40 s		55	1 min	
Amplificación	72	2 min		72	3 min	
Extensión final	72	5 min	1	72	5 min	1
"Hibridación/ extensión"						
Activación	94	4 min	2	94	4 min	2
Hibridación	55	3 min		57	3 min	
Extensión final	72	3 min		72	2 min	
PCR 3						
Activación	94	5 min	1	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	30	94	30 s	30
Hibridación	55	40 s		57	40 s	
Amplificación	72	3 min		72	3 min	
Extensión final	72	5 min	1	72	5 min	1

^a La temperatura de hibridación se ajustó teniendo en cuenta la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos (T = T_m - 5 °C)



Figura 3.1. Esquema de la estrategia utilizada para la construcción de las quimeras QLAS1 (A) y QSLA2 (B). En la primera etapa se amplifican por separado (PCR1 y PCR2) los dos fragmentos que conformarán el gen quimérico. Una vez amplificados los fragmentos, éstos se hibridan y completan en una segunda etapa sin cebadores (“Hibridación/extensión”). Finalmente, al producto de esta hibridación se le añaden los cebadores y se amplifica en la PCR3. Los cebadores LA-Skl *rev* y *for* y Skl-LA *rev* y *for* poseen una extensión en 5’ (representada con rayas) complementaria a la parte final del fragmento adyacente en el gen quimérico correspondiente. Cada quimera mantiene el “linker” y parte de la primera repetición del CBM de la enzima parental que aporta el módulo catalítico. **(A)** En amarillo y verde, secuencias correspondientes a N-LytA y C-LytA, respectivamente, y **(B)** en azul y violeta, secuencias correspondientes a N-Skl y C-Skl respectivamente. (Las secuencias de LytA, Skl y de cada quimera se encuentran detalladas en el **Anexo**).

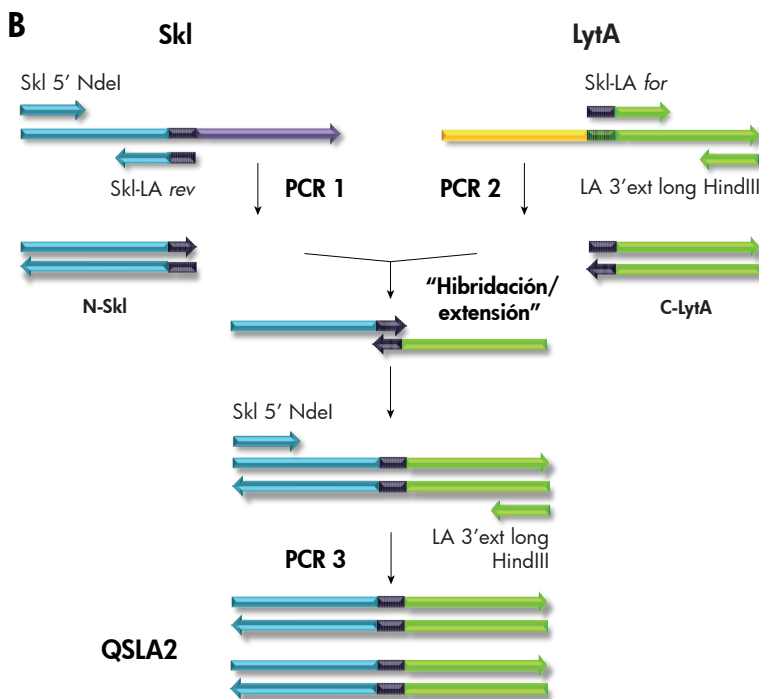
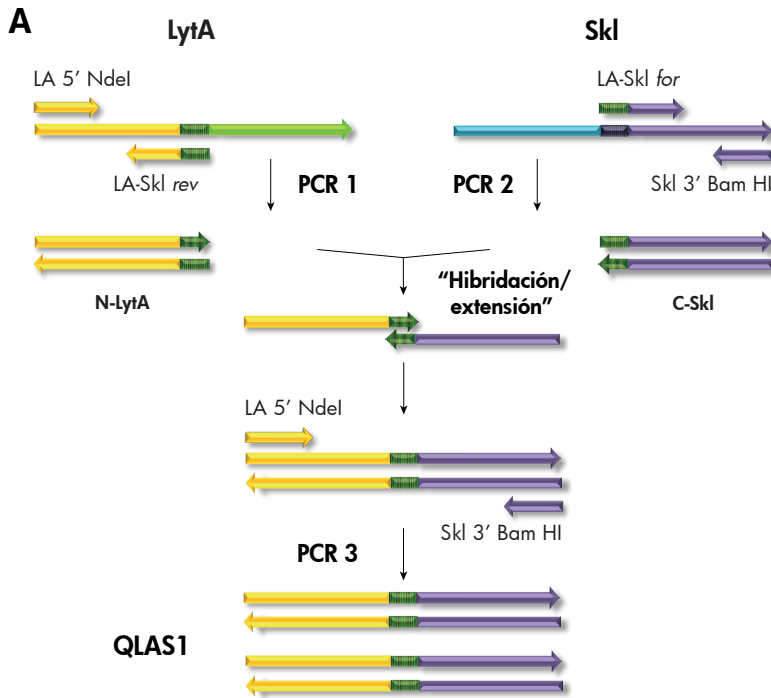


Tabla 3.5. Reactivos y cantidades empleadas en las PCRs para la construcción de los genes quiméricos

	QLAS1		QSLA2	
PCR 1 100 µl totales	DNA R6	300 ng	DNA SK137	300 ng
	LA 5' NdeI (5 µM)	10 µl	Sk1 5' NdeI (5 µM)	10 µl
	LA-Skl <i>rev</i> (5 µM)	10 µl	Sk1-LA <i>rev</i> (5 µM)	10 µl
	dNTPs (2,5 mM)	10 µl	dNTPs (2,5 mM)	10 µl
	Buffer 10 ×	10 µl	Buffer 10 ×	10 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	4 µl	MgCl ₂ (50 mM)	4 µl
	<i>Pfu</i>	3 µl	<i>Pfu</i>	3 µl
	H ₂ O	51 µl	H ₂ O	51 µl
PCR 2 100 µl totales	DNA SK137	300 ng	DNA R6	300 ng
	LA-Skl <i>for</i> (5 µM)	10 µl	Sk1-LA <i>for</i> (5 µM)	10 µl
	Sk1 3' Bam HI (5 µM)	10 µl	LA 3' ext long HindIII (5 µM)	10 µl
	dNTPs (2,5 mM)	10 µl	dNTPs (2,5 mM)	10 µl
	Buffer 10 ×	10 µl	Buffer 10 ×	10 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	4 µl	MgCl ₂ (50 mM)	4 µl
	<i>Pfu</i>	3 µl	<i>Pfu</i>	3 µl
	H ₂ O	51 µl	H ₂ O	51 µl
"Hibridación/extensión" 80 µl totales	Fragmento 1 (N-LytA)	100 ng	Fragmento 1 (N-Skl)	100 ng
	Fragmento 2 (C-Skl)	100 ng	Fragmento 2 (C-LytA)	100 ng
	dNTPs (2,5 mM)	10 µl	dNTPs (2,5 mM)	10 µl
	MgCl ₂ (50 mM)	4 µl	MgCl ₂ (50 mM)	4 µl
	<i>Pfu</i>	3 µl	<i>Pfu</i>	3 µl
	Buffer 10 ×	10 µl	Buffer 10 ×	10 µl
	H ₂ O	47,2 µl	H ₂ O	47,2 µl
PCR 3 sobre los 80 µl anteriores	LA 5' NdeI (5 µM)	10 µl	Sk1 5' NdeI (5 µM)	10 µl
	Sk1 3' Bam HI (5 µM)	10 µl	LA 3' ext long HindIII (5 µM)	10 µl

Los productos resultantes de la reacción de PCR se purificaron según se indica en el **apartado 3.2.3.c** y se analizaron en geles de agarosa al 1,5 %. Los fragmentos de interés se recuperaron del gel según se indica en el **apartado 3.2.3.b**.

Los genes quiméricos se clonaron en el plásmido pGEM-T previamente cortado para presentar timina (T) en sus extremos, por lo que los genes de las quimeras requirieron una reacción previa de adición de dATP para hacer complementarios sus extremos (la *Pfu* no añade adenina en los extremos). Esta reacción se llevó a cabo incubando el gen quimérico con 5 μ l dATP 2 mM, 2,5 μ l $MgCl_2$ 50 mM, 5 μ l *Taq* polimerasa con su correspondiente tampón comercial (5 μ l) y H_2O hasta 50 μ l finales durante 30 min a 70 °C. La ligación con el pGEM-T se realizó con la DNA ligasa del fago T4 durante 2-3 h a temperatura ambiente (**apartado 3.2.3.e**) utilizando 1 μ l de pGEM-T (50 ng/ μ l) y 6 μ l del gen quimérico, realizándose paralelamente un control de religación sin añadir inserto.

Con los plásmidos pGEM-T modificados se transformaron, por choque térmico (**apartado 3.2.2.a**), células de *E. coli* DH10B y se procedió a la selección, basada en el color, de los clones que contenían el gen codificante para cada una de las quimeras. Esto es posible porque el plásmido empleado contiene el gen de la β -galactosidasa, capaz de hidrolizar el X-Gal añadido al medio de cultivo dando como resultado un producto azul (colonias azules). La inserción de los fragmentos en una región de clonaje múltiple (MCS) localizada dentro de la zona codificante de la β -galactosidasa impide la activación de la misma, dando como resultado que las cepas portadoras de la inserción formen colonias blancas. Estas colonias se seleccionaron para la amplificación y extracción del plásmido (**apartado 3.2.3.a**), y la comprobación de la secuencia del inserto (bien por secuenciación o mediante una PCR con los cebadores correspondientes al mismo). Los plásmidos portadores del inserto se digirieron utilizando los sitios de corte introducidos en los extremos (NdeI y BamHI para QLAS1 y NdeI y HindIII para QSLA2) según se indica en el **apartado 3.2.3.e**. Se aislaron los fragmentos con las secuencias codificantes de las quimeras y por ligación se subclonaron en el plásmido pT7-7 (**apartados 3.2.3.b** y **3.2.3.e**), previamente cortado con las mismas enzimas de restricción que el gen quimérico a insertar. Así se obtuvieron los plásmidos derivados de pT7-7 pLASkl y pSkllA, con los que se transformaron, por electroporación (**apartado 3.2.2.b**), células de *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperexpresión de las quimeras (controlada por el promotor T7, inducible por IPTG). Se verificó mediante secuenciación que los plásmidos pLASkl y pSkllA contenían el gen íntegro de QLAS1 y QSLA2, respectivamente.

3.2.4.b. Construcción de mutantes de Skl

Las secuencias codificantes de los mutantes puntuales C31A, H92A y E109A de Skl, obtenidas por síntesis química, fueron suministradas por ATG Biosynthetics (<http://www.atg-biosynthetics.com>) en plásmidos derivados de pUC (**Tabla 3.2**). Para optimizar la expresión, los fragmentos relevantes de DNA se subclonaron en el plásmido pT7-7 utilizando las enzimas de restricción NdeI y HindIII. Con las mezclas de ligación se transformó por electroporación la cepa DH10B de *E. coli* y se seleccionaron clones que contenían los plásmidos recombinantes (**Tabla 3.2**). Éstos se aislaron para transformar por choque térmico la cepa hiperproductora BL21 (DE3) de *E. coli* (**Tabla 3.1**). La correcta secuencia de los genes mutados en los posibles positivos se comprobó mediante secuenciación.

3.2.5. Técnicas de Proteínas

3.2.5.a. Expresión, purificación y cuantificación de proteínas

Todas las PG hidrolasas utilizadas en el presente trabajo se expresaron en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los derivados de plásmidos de expresión portadores de las correspondientes regiones codificantes (**Tabla 3.2**). Los cultivos (1 - 2 litros) se crecieron a 37°C en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) hasta una $DO_{600} \cong 0,6$, tras lo cual se indujo la expresión de las proteínas añadiendo IPTG (50 µM final) y se incubó durante toda la noche a 30°C (Skl silvestre, mutantes y enzimas quimeras) o 37°C (LytA). Las células se recolectaron por centrifugación (13.000 rpm, 4°C, 5 min) en la fase estacionaria de crecimiento utilizando una centrífuga *Sorvall* (rotor SS34). El sedimento se resuspendió en 30-40 ml de tampón PB (fosfato sódico 20 mM, pH 6,9) por cada dos litros de cultivo, almacenándose a -20°C hasta su lisis. Las células se lisaron en una prensa de French (French® Pressure Cell Press-Thermo) a $8,3 \times 10^6$ Pa y el extracto celular obtenido se centrifugó en las condiciones arriba indicadas durante 20 minutos. Tras recoger el sobrenadante se añadió sulfato de estreptomicina (~67 mg/10 ml de cultivo lisado) para inducir la precipitación del DNA, manteniendo el extracto en frío y con agitación suave durante 20 minutos. El precipitado se eliminó por centrifugación (13.000 rpm, 4°C, 20 min) y se añadió NaCl (1 M final) al sobrenadante, donde se encuentra la proteína.

Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando como soporte DEAE-celulosa, cuyos grupos di-etilaminoetanol son

reconocidos como análogos de colina por los CBMs (Sánchez-Puelles *et al.*, 1990). Tras cargar el sobrenadante en la columna (15 × 2 cm) equilibrada en tampón PB, se procedió al lavado de la misma con dicho tampón suplementado con 1,5 M NaCl (0,1 M NaCl para QLAS1) hasta eliminar todos los demás componentes retenidos en la columna, lo que se verificó siguiendo la caída de la absorbancia del eluido a 260 (DO₂₆₀) y 280 nm (DO₂₈₀) (espectrómetro Shimadzu UV-210). Finalmente se procedió a eluir la proteína retenida por interacción específica con el DEAE utilizando tampón PB con NaCl 100 mM y colina 280 mM, recogiendo fracciones de ~1 ml que se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE (**apartado 3.2.5.b**). Todo el proceso de purificación se realizó a 4 °C.

Las fracciones electroforéticamente puras (> 95%) con valores de la relación DO₂₈₀/DO₂₆₀ ≥ 1,9 se almacenaron a -20 °C hasta su uso, momento en el que se dializaron durante 24 horas frente al tampón deseado (5 × 500 ml) y se centrifugaron a 13.000 rpm (MSE MicroCentaur) durante 5 minutos para eliminar posibles precipitados. Cuando fue necesario, las muestras se concentraron por ultrafiltración (Centriprep®-Millipore YM-10 MW) hasta alcanzar la concentración deseada.

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente utilizando los siguientes coeficientes de extinción molar a 280 nm (ϵ_{280}): 136.375 M⁻¹ cm⁻¹ (Skl silvestre, Skl C31A, Skl H92A y Skl E109A), 119.290 M⁻¹ cm⁻¹ (QLAS1) y 132.240 M⁻¹ cm⁻¹ (QSLA2), calculados teóricamente a partir de la secuencia de aminoácidos con el programa ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005).

3.2.5.b. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La pureza de las proteínas eluidas de la columna de afinidad se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS (SDS-PAGE), según la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y las bandas de proteína se tiñeron con una solución al 0,25% (p/v) de azul de Coomassie en metanol (45%, v/v) y ácido acético (5%, v/v).

3.2.5.c. Espectrometría de masas

La homogeneidad y la masa de las proteínas purificadas se verificó también mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el Servicio de Cromatografía y Espectrometría de Masas del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC). Las medidas se realizaron en

un espectrómetro de masas Voyager DEPRO (Applied Biosystems) equipado con un láser de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm, anchura de pulso = 10 ns y $\nu = 3$ Hz) y una fuente iónica con extracción retardada. Los iones positivos generados por la desorción láser pasan a un tubo de vuelo de 1,3 m de longitud, con un voltaje de aceleración de 25 kV, trabajándose en modo lineal. Los espectros se obtuvieron registrando una media de 500 disparos y la matriz empleada fue ácido sinapínico (10 mg/ml en TFA 0,3%, acetonitrilo 70:30). La calibración de los espectros fue externa, utilizándose apomioglobina de caballo como estándar.

3.2.5.d. Dicroísmo circular (DC)

Los espectros de DC tienen su origen en la capacidad de las moléculas quirales para absorber de forma diferencial las dos ondas polarizadas circularmente a derecha (R) e izquierda (L) que conforman un haz de luz polarizada en el plano. Debido a ello, la luz incidente pasa a estar elípticamente polarizada cuando emerge de la muestra (**Figura 3.2**). La absorción diferencial, ΔA , varía con la longitud de onda dando lugar a la aparición de bandas positivas o negativas en el espectro de dicroísmo circular y su relación con la elipticidad, Θ , expresada en milésimas de grado, viene dada por la expresión:

$$\Theta = 32,98 \Delta A \quad [3.1]$$

siendo $\Theta = \tan^{-1} (b/a)$, donde a y b son los ejes mayor y menor, respectivamente, de la elipse descrita por la onda emergente (Kelly *et al.*, 2005) (**Figura 3.2**).

En proteínas, la elipticidad se expresa normalmente como elipticidad promedio por residuo ($\text{grados cm}^2/\text{dmol}$), calculada a mediante la expresión:

$$[\Theta] = \Theta \times M_{rr} / (10 \times C_{(\text{mg/ml})} \times l) \quad [3.2]$$

donde $C_{(\text{mg/ml})}$ es la concentración de proteína en mg/ml, M_{rr} la masa molecular promedio por residuo y l el paso óptico en cm.

En la región del ultravioleta cercano los cromóforos más importantes de las proteínas son las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos y el enlace disulfuro (**Tabla 3.6**) (Woody, 1995). La asimetría en estos grupos se debe al entorno en el que se encuentran dentro de la estructura nativa,

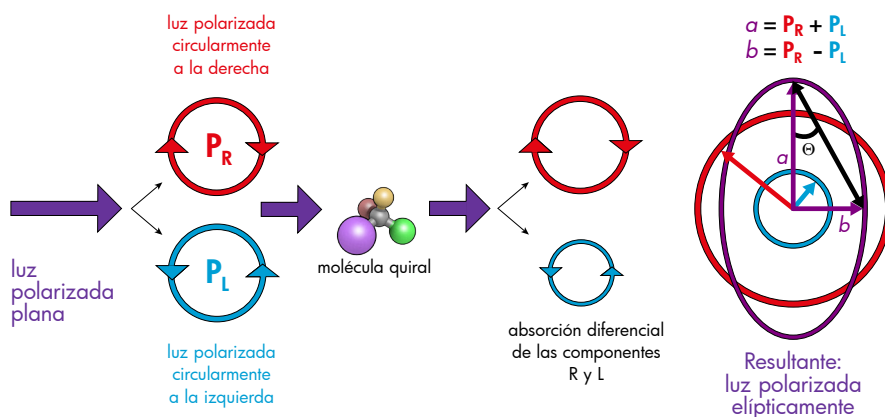


Figura 3.2. Esquema ilustrativo de la generación de un espectro de dicroísmo circular.

La luz polarizada plana consta de dos componentes, polarizadas circularmente a derecha (P_R) e izquierda (P_L). Las moléculas quirales son capaces de absorber diferencialmente cada una de las componentes, con lo que el haz de luz resultante está polarizado de forma elíptica, en un grado que depende de la relación entre los radios mayor (a) y menor (b) de la elipse.

Tabla 3.6. Cromóforos más importantes de las proteínas en la región del ultravioleta cercano

Intervalo	Cromóforos
250-270 nm	cadena lateral de fenilalanina
270-290 nm	cadena lateral de tirosina
280-300 nm	cadena lateral del triptófano
250-350 nm	puentes disulfuro

por lo que su contribución a los espectros de DC en el UV-cercano será un reflejo de la conformación global de la proteína (estructuras terciaria y cuaternaria) (Martin & Schilstra, 2008; Woody, 1995).

En la región del ultravioleta lejano ($\lambda < 240$ nm), el principal cromóforo es el enlace peptídico, cuya asimetría se debe a la ordenación espacial de la cadena polipeptídica, es decir, a la estructura secundaria. Los espectros en esta región se pueden considerar una combinación lineal de las contribuciones debidas a los distintos elementos de estructura secundaria (hélices- α , láminas- β , giros, segmentos aperiódicos, etc.) (Brahms & Brahms, 1980; Martin & Schilstra, 2008), aunque los aminoácidos

aromáticos pueden dar lugar también a espectros en la región de 220 - 230 nm, e incluso a longitudes de onda menores (Brahms & Brahms, 1980; Freskgård *et al.*, 1994; Grishina & Woody, 1994). El DC permite estudiar el contenido en estructura secundaria de las proteínas y caracterizar los cambios conformacionales inducidos por variaciones en la composición y la temperatura del medio o por la interacción con ligandos, y estimar las constantes de equilibrio de los procesos respectivos.

3.2.5.d1. Recogida de espectros

Los experimentos de DC se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un sistema Peltier para controlar la temperatura en la celda de medida. Los espectros se registraron a 20 nm/min con tiempos de respuesta de 4 segundos y se recogieron datos cada 0,2 nm, realizando al menos tres acumulaciones de cada espectro para mejorar la relación señal/ruido. Las concentraciones de proteína empleadas fueron 0,16-0,75 mg/ml en el UV-lejano, dependiendo del paso óptico (0,1 ó 0,02 cm) y del rango de longitud de onda utilizado, y 0,5 mg/ml en el UV-cercano (paso óptico de 1 cm). En todos los casos se registró el espectro del tampón bajo condiciones experimentales idénticas a las utilizadas con la proteína correspondiente. Tras sustraer la contribución del mismo, los datos se transformaron en elipticidades molares por residuo. Tanto el registro de los datos experimentales como el tratamiento de los mismos se realizaron con el programa Spectra Manager (**Tabla 8.2**).

3.2.5.d2. Curvas de valoración con colina

La afinidad aparente de SkI y las quimeras QLAS1 y QSLA2 por colina se caracterizó por DC en tampón PB a 20°C (pH 6,5). Se registraron los espectros (UV-cercano y lejano) de la proteína a concentraciones crecientes de colina tras agregar, de forma progresiva, pequeños volúmenes de una disolución concentrada de la misma, procurando que la variación total de volumen fuera inferior al 10%. Las curvas de valoración se obtuvieron representando la elipticidad molar por residuo de la proteína en función de la concentración de colina, a la longitud o longitudes de onda donde la formación del complejo induce mayores cambios en la intensidad del espectro. Las constantes aparentes de unión se determinaron a partir del ajuste de la ecuación de Hill a las curvas de unión por mínimos cuadrados no lineales con el programa Origin 6.0 (**Tabla 8.2**), asumiendo una ($n=1$) o dos ($n=2$) clases de sitios de unión independientes (**ecuación [3.3]**)

$$\Theta = \Theta_0 + \sum_{i=1,n} (\Theta_i - \Theta_{i-1}) \times (1 / (1 + (K_{0,5 \text{ app}}^i / [L])^{a_i})) \quad [3.3]$$

siendo $K_{0,5 \text{ app}}^i$ la constante aparente de disociación para el sitio i , Θ_0 y Θ los valores de la elipticidad en ausencia y en presencia de ligando a la concentración L , respectivamente; $(\Theta_i - \Theta_{i-1})$ el incremento de la elipticidad tras la saturación de los sitios de tipo i , y a_i , la cooperatividad en la unión del ligando a los mismos.

La concentración de colina se determinó a partir de la medida del incremento del índice de refracción de la solución con respecto al tampón sin colina, utilizando un interferómetro diferencial Carl Zeiss Jena LI3 previamente calibrado para la luz de la línea del sodio a 589×10^{-7} cm. Las medidas se realizaron en una célula de doble sector con paso óptico de 1 cm.

3.2.5.d3. Barridos de temperatura

La desnaturalización térmica de las proteínas se siguió por DC monitorizando los cambios inducidos por el aumento de la temperatura en los espectros de las mismas. Los experimentos se realizaron a velocidad de calentamiento constante, registrando la elipticidad a una determinada longitud de onda cada $0,2^\circ\text{C}$ con un tiempo de espera de 4 segundos. En determinados experimentos se registró simultáneamente el espectro completo de la proteína a temperaturas prefijadas, utilizando las condiciones descritas en el apartado anterior (3.2.5.d2). En ambos casos se sustrajo la contribución del tampón de medida a los datos experimentales. Tanto la adquisición de datos como el cálculo de las elipticidades promedio por residuo se realizaron con el programa Spectra Manager.

Debido a la irreversibilidad de la desnaturalización térmica de Sk1 y las quimeras QLAS1 y QSLA2, los perfiles de desnaturalización térmica se describieron fenomenológicamente, ajustándolos a una o dos sigmoideas, dependiendo del número de transiciones observadas, utilizando la ecuación [3.4]:

$$\Theta(T) = \Theta_N + \sum_{i=1}^n \Delta\Theta_i \{ \exp[-H_{Di}(T_m^i - T)/R \cdot T \cdot T_m^i] \} / \{ 1 + \exp[-A_i(T_m^i - T)/R \cdot T \cdot T_m^i] \} \quad [3.4]$$

siendo $\Theta(T)$ la elipticidad a la temperatura T (grados Kelvin), Θ_N la elipticidad de la proteína nativa, n el número de transiciones, $\Delta\Theta_i$ el incremento de la elipticidad asociado a la transición i , R la constante de los

gases, y T_m^i y A_i la temperatura media de transición y un parámetro que describe la cooperatividad (pendiente) de la transición correspondiente.

3.2.5.e. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La estabilidad térmica y la organización en dominios de las proteínas estudiadas se caracterizaron también por calorimetría diferencial de barrido, tanto en presencia como en ausencia de colina.

La calorimetría diferencial de barrido o DSC (del inglés Differential Scanning Calorimetry) permite estudiar la estabilidad y la organización estructural de las macromoléculas biológicas registrando la capacidad calorífica (C_p) de la biomolécula como una función continua de la temperatura, a presión y velocidad de calentamiento constantes (**Figura 3.3**).

A partir de los termogramas se puede caracterizar el proceso energéticamente, mediante la relación existente entre ΔC_{p_d} (variación de la capacidad calorífica), ΔH_d (variación de entalpía) y ΔS_d (variación de entropía) (Privalov, 1979). La dependencia de C_p con la temperatura viene dada por la **ecuación [3.5]**, en la que la constante de desnaturalización a la temperatura T , $K_d(T)$, puede calcularse con la **expresión [3.6]**.

siendo C_{p_N} la capacidad calorífica de la forma nativa y T_m la posición del máximo en la curva de C_p .

$$C_p = C_{p_N} + \left[\frac{K_d(T) \Delta C_p}{1 + K_d(T)} + \frac{K_d(T) (\Delta H_d(T))^2}{RT^2 (1 + K_d(T))^2} \right] \quad [3.5]$$

$$K_d(T) = \exp \left\{ -\frac{\Delta H_d}{RT} \left[1 - \frac{T}{T_m} \right] - \frac{\Delta C_{p_d}}{RT} \left[T - T_m - T \cdot \ln \frac{T}{T_m} \right] \right\} \quad [3.6]$$

Aplicada al estudio de proteínas, la técnica de DSC puede proporcionar información sobre la energética y el mecanismo de desnaturalización (interacciones entre dominios, procesos asociados a la pérdida de estructura, etc.) cuando la desnaturalización tiene lugar en condiciones de equilibrio. En el caso de procesos irreversibles es posible obtener información termodinámica y estructural cuando la población de formas reversiblemente desnaturalizadas es significativa dentro del intervalo de temperatura en que tiene lugar la transición, o información cinética cuando la desnaturalización está controlada por la etapa irreversible (Sanchez-Ruiz, 1992; Varea *et al.*, 2004).

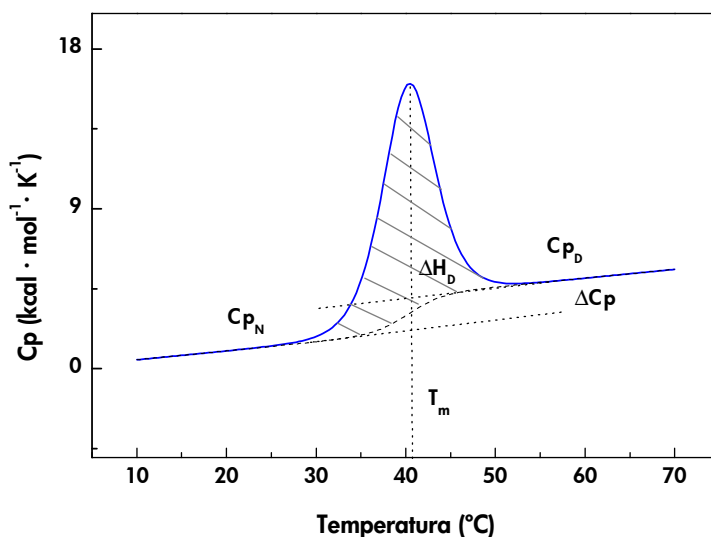


Figura 3.3. Curva de capacidad calorífica en función de la temperatura. C_{pN} y C_{pD} son las capacidades caloríficas del estado nativo y desnaturalizado de la proteína, respectivamente. El trazo discontinuo entre ambas señales indica la línea de base química, observándose la variación de la capacidad calorífica del sistema con el aumento de la temperatura. T_m es la temperatura del máximo de la transición y ΔH_d es la entalpía total del proceso de desnaturalización, cuyo valor viene dado por el área comprendida entre la curva experimental y la línea de base química.

Los experimentos de DSC se realizaron en un microcalorímetro VP-DSC (MicroCal Inc.) a una presión de 2 atmósferas y desgasificando previamente todas las soluciones utilizadas, para evitar que la posible formación de burbujas durante el calentamiento distorsione el termograma. La línea de base instrumental se registró antes de realizar el experimento con la proteína, cargando, tanto la célula de muestra ($\approx 0,5$ ml) como la de referencia, con el tampón de la última diálisis. Las curvas de capacidad calorífica de la proteína se corrigieron restando la línea de base instrumental y se normalizaron respecto al número de moles de proteína en la celda de medida. La variación de capacidad calorífica entre el estado nativo y el desnaturalizado en la región de la transición (línea de base química) se aproximó, generalmente, mediante una función cúbica.

La adquisición de datos y el análisis posterior de las curvas experimentales se realizaron con los programas MCS Observer y Origin Microcal LLC DSC (MicroCal Inc.), respectivamente (Tabla 8.2).

La pérdida de las transiciones tras el primer barrido puso de manifiesto la irreversibilidad del proceso de desnaturalización en todos los casos estudiados, por lo que se realizaron experimentos a varias velocidades de calentamiento, a fin de evaluar la influencia de la etapa irreversible sobre los termogramas (Sanchez-Ruiz, 1992; Usobiaga *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2004). Las curvas de desnaturalización de SkI en ausencia y en presencia de colina se analizaron utilizando, respectivamente, un modelo con una o dos transiciones irreversibles entre dos estados mediante la **ecuación** [3.7]:

$$Cp = \sum_1^n (\Delta H_{di} \cdot Ea_i / R \cdot T_{mi}^2) \cdot \exp \{1/\exp [Ea_i(T - T_{mi})/R \cdot T^2]\} \quad [3.7]$$

donde n es el número de transiciones, ΔH_{di} , Ea_i y T_{mi} la entalpía de desnaturalización, la energía de activación del proceso irreversible y la temperatura del máximo de la función de capacidad calorífica para la transición i , R la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

3.2.5.f. Ultracentrifugación analítica

La ultracentrifugación analítica engloba un conjunto de técnicas que permiten obtener información sobre la masa molecular, heterogeneidad, forma hidrodinámica aproximada y estado de asociación en solución de proteínas y otras biomoléculas. Permite, además, caracterizar procesos de asociación en los que la masa molecular del complejo resultante difiere de forma significativa de las de sus componentes aislados (Pedersen, 1983; Schachman, 1989; Weber, 1992; Wyman & Gill, 1990). Desde un punto de experimental hay dos aproximaciones básicas para estudiar un sistema: equilibrio de sedimentación y velocidad de sedimentación, cuya diferencia fundamental es la velocidad angular, ω , del campo centrífugo aplicado (Cole *et al.*, 2008).

3.2.5.f1. Equilibrio de sedimentación

En el equilibrio de sedimentación la macromolécula se somete a un campo centrífugo moderado que permite alcanzar la condición de equilibrio termodinámico entre las moléculas que se mueven hacia el fondo de la célula (acción de la fuerza centrífuga) y las que difunden hacia el frente (compensación del gradiente de concentración creado por el campo centrífugo) en cada posición radial. Cuando se alcanza el equilibrio, el gradiente de concentración sólo depende de la masa molecular de la/s macromolécula/s estudiada/s y de la dependencia de ésta con la concentración, y viene descrito por la **ecuación** [3.8]:

$$M_{w,app} = \frac{2RT}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2} d \frac{\ln C}{d(r^2)} \quad [3.8]$$

donde $M_{w,app}$ es la masa molecular aparente, T es la temperatura absoluta, C la concentración de macromolécula, \bar{v} el volumen específico parcial de la proteína, ρ la densidad de la disolución, ω la velocidad angular y r la distancia radial. Con este tipo de experimentos pueden definirse masas moleculares, la estequiometría de un complejo, las constantes de asociación que dan lugar a la formación del mismo y la no-idealidad de una solución.

3.2.5.f2. Velocidad de sedimentación

En los experimentos de velocidad de sedimentación las macromoléculas se someten a un campo centrífugo elevado ($\omega \geq 45.000$ rpm), formándose un frente en movimiento que da lugar a un transporte neto de masa hacia el fondo de la célula, al ser la fuerza de sedimentación mayor que la de difusión. La medida de la concentración de macromolécula en función de la distancia radial (perfiles de sedimentación) a intervalos regulares de tiempo permite determinar la velocidad del movimiento del frente (relacionada con el coeficiente de sedimentación de la partícula) y el ensanchamiento del mismo (relacionado con el coeficiente de difusión) en función del tiempo (Hansen *et al.*, 1994; Ralston, 1993). Ambos coeficientes están relacionados con el tamaño y la forma de la molécula o moléculas que sedimentan. La variación del perfil de sedimentación en función del radio y del tiempo viene descrita por la ecuación de Lamm (**ecuación 3.9**), cuyo ajuste a los datos experimentales permite obtener los coeficientes de sedimentación (s) y difusión (D):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{r} \cdot \frac{d}{dr} \left[rD \frac{dC}{dr} - s \omega^2 r^2 C \right] \quad [3.9]$$

siendo ω la velocidad angular, C la concentración de proteína, r la distancia radial y t el tiempo.

Los experimentos a 20°C se realizaron en una ultracentrífuga Optima-XLA (Beckman-Coulter) equipada con un sistema de detección UV-Visible que permite la selección de la longitud de onda en el intervalo 200-700 nm. Las medidas de velocidad de sedimentación a 4°C se llevaron a cabo en

una Optima XL-1 (Beckman-Coulter) equipada con sistema de detección por interferencias. En ambos casos se utilizó un rotor An50Ti y células de doble sector con ventanas de cuarzo de 12 mm de paso óptico y un cuerpo central de seis (equilibrio de sedimentación) o dos (velocidad de sedimentación) agujeros. Las muestras de proteína se equilibraron previamente en el tampón de medida y, en su caso, la concentración requerida de colina se añadió directamente a la muestra o se incluyó en el tampón de diálisis. Los volúmenes específicos parciales (\bar{v}) de las proteínas a 20°C, necesarios para el análisis de los datos, se calcularon a partir de la composición de aminoácidos con el programa SEDNTERP (Laue *et al.*, 1992; **Tabla 8.2**) y son 0,722 (Skl silvestre, mutantes catalíticos y QLAS1) y 0,721 (LytA y QSLA2). La densidad y viscosidad de los tampones se calcularon con SEDNTERP y las de las soluciones de colina con las ecuaciones descritas por Shaukat y Buchner (2011).

Las medidas de equilibrio de sedimentación se realizaron a tres velocidades distintas, para analizar la posible heterogeneidad de la muestra, utilizando muestras de 80 μ l (\sim 0,2 mg/ml). Con este volumen de muestra y a las velocidades seleccionadas, el equilibrio se alcanza en menos de 12 horas. La contribución de la absorbancia del tampón se determinó sedimentando el material proteico a 45.000 rpm durante 6 horas y haciendo la lectura de la absorbancia en las proximidades del menisco. El peso molecular promedio aparente se obtuvo ajustando a los datos experimentales la ecuación que describe la distribución radial del gradiente de concentración para una especie ideal en el equilibrio con la versión 1.1.2 del programa HeteroAnalysis (**Tabla 8.2**).

Las medidas de velocidad de sedimentación se realizaron a 20°C (\sim 0,2 mg/ml) o 4°C (\sim 4 mg/ml) utilizando muestras de 400 μ l y una velocidad de 45.000 rpm. El coeficiente de sedimentación se calculó a partir de la velocidad de movimiento del frente de sedimentación utilizando el programa SEDFIT (Schuck, 2000; **Tabla 8.2**), con el que se corrigieron también los valores experimentales a las condiciones de referencia ($s_{20,w}$, agua a 20°C). El coeficiente de fricción traslacional (f/f_0) y el radio de Stokes (R_s) se calcularon a partir de los valores de $s_{20,w}$ y la masa molecular con el programa SEDNTERP, utilizando para ello el grado de hidratación de la proteína y el volumen específico obtenidos previamente a partir de la secuencia aminoacídica con SEDNTERP.

3.2.5.g. SAXS

SAXS (del inglés Small Angle X-ray Scattering) es una técnica analítica en la que la dispersión elástica que sufren los rayos-X al atravesar una muestra en solución se registra a valores pequeños del ángulo formado entre el haz incidente y el dispersado ($\sim 0,1^\circ - 10^\circ$) (Putnam *et al.*, 2007). En la **Figura 3.4** se muestra el proceso seguido para realizar y procesar un experimento de SAXS. En soluciones diluidas, y debido a la distribución al azar de las moléculas en solución, la dispersión tiene lugar con simetría radial.

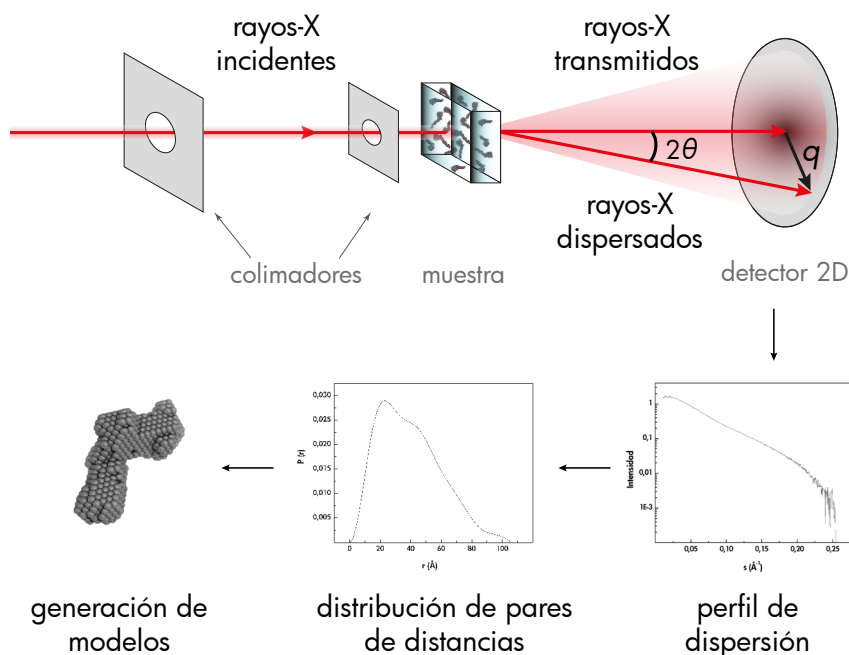


Figura 3.4. Representación esquemática de un experimento de SAXS. Los rayos-X incidentes, altamente colimados, se dispersan tras interaccionar con la muestra. El ángulo de dispersión respecto al haz es 2θ . El perfil de dispersión, tras restar la contribución del tampón, es función del vector de dispersión q (momento de transferencia) ($q = (4\pi \sin \theta)/\lambda$, siendo λ la longitud de onda del haz de rayos-X incidente). A partir del perfil de dispersión se calcula la distribución de pares de distancias, que permite obtener las dimensiones máximas de la partícula (D_{max}), y el radio de giro (R_g) con los cuales se acota el espacio en el que se pueden generar de forma iterativa modelos tridimensionales de esferas, hasta que su perfil teórico de dispersión se asemeje lo más posible al perfil experimental.

SAXS es además un método de contraste en el que el valor promedio de la señal dispersada por el soluto se obtiene tras sustraer la contribución del solvente. En muestras monodispersas, es proporcional a la dispersión de una sola molécula promediada sobre todas las orientaciones posibles (Svergun, 1992). Por ese motivo, y a diferencia de la difracción de rayos-X, los espectros de SAXS carecen de la información relativa a las fases y su transformada de Fourier inversa proporciona, en vez de la estructura tridimensional, la función de distribución de pares de distancias (monodimensional) entre dos puntos de la partícula ($P(r)$) (Koch *et al.*, 2003). Los perfiles de dispersión permiten obtener además de forma directa otros parámetros relacionados con el tamaño, forma y estado de asociación de la molécula estudiada, como son la masa molecular, la longitud máxima de la partícula (D_{max}) y el radio de giro (R_g), relacionado con la distribución de masas dentro de la misma.

Aunque no es posible obtener una estructura tridimensional a partir de los perfiles de dispersión, sí se puede calcular el perfil de dispersión de cualquier estructura conocida a la resolución deseada. Esto permite obtener modelos 3D *ab initio* de una partícula en solución a partir de los datos derivados de los espectros de SAXS con una resolución de nanómetros, cuando se trabaja con muestras homogéneas, y obtener información sobre las características de sistemas flexibles (Chacon *et al.*, 1998; Petoukhov & Svergun, 2005; Putnam *et al.*, 2007; Svergun & Koch, 2002). Todos los métodos *ab initio* (DAMMIN, DAMMIF, DALAI_GA, GASBOR, etc.) generan modelos tridimensionales formados por esferas idénticas cuyos perfiles de dispersión teóricos se comparan iterativamente con el perfil experimental hasta obtener un modelo cuyo perfil se asemeje lo más posible al mismo (Chacón *et al.*, 2000; Franke & Svergun, 2009; Svergun, 1999; Svergun *et al.*, 2001).

Por otro lado, la combinación de datos de SAXS con modelos estructurales a alta resolución permite analizar la organización de proteínas modulares o complejos macromoleculares, bien por comparación de los perfiles teóricos de dispersión de los modelos propuestos manualmente con los experimentales, o bien mediante modelado de la disposición de los diferentes elementos de estructura utilizando métodos de cuerpo rígido (BUNCH y SASREF), y comparando el perfil de dispersión teórico del modelo con el perfil experimental (Petoukhov & Svergun, 2005).

3.2.5.g1. Recogida de espectros

Tras definir mediante ultracentrifugación analítica las condiciones adecuadas para obtener las formas monoméricas o diméricas de SkI en solución, se registraron los espectros de SAXS, en ausencia y en presencia de colina, en la línea 2.1 del Sincrotrón de Daresbury y en la línea BM25 del ESRF (European Synchrotron Radiation Facility; Grenoble). Se cubrió un rango del vector de dispersión (definido como $q = 4\pi(\sin\theta/\lambda)$ comprendido entre 0,01 y 0,25 Å⁻¹. Los valores absolutos de q se obtuvieron por referencia a las repeticiones de 67 nm del colágeno hidratado de cola de rata (Andreu *et al.*, 1992). Las medidas se realizaron a 4°C y los espectros de dispersión se registraron durante 30 periodos (“frames”) de 30 segundos, utilizando una cámara oscilante para minimizar el posible daño de las muestras por efecto de la radiación. Las proteínas se dializaron previamente frente al tampón de medida y se centrifugaron a 4°C en una ultracentrífuga Optima de Beckman Coulter (20-30 minutos, 45.000 rpm, rotor TLA-100.3), desechando el tercio inferior de las muestras para evitar la interferencia de posibles agregados. Los espectros se registraron a tres concentraciones diferentes de proteína (2-8 mg/ml) para evaluar posibles efectos derivados de la asociación o repulsión entre moléculas y obtener, en su caso, el perfil de dispersión a dilución infinita (Putnam *et al.*, 2007). Los espectros del solvente, registrados con el tampón del último dializado, se sustrajeron de los datos de la muestra para obtener los perfiles de dispersión netos de las proteínas.

3.2.5.g2. Procesado y análisis de datos

Los datos experimentales se normalizaron por la intensidad del haz y por la respuesta del detector antes de ser tratados con el software suministrado por el “Collaborative Computational Project for Fiber Diffraction and Solution Scattering” (**Tabla 8.2**). Los espectros monodimensionales obtenidos se trataron con programa Primus, dentro del conjunto de programas ATSAS (**Tabla 8.2**), siguiendo el siguiente protocolo:

- promediado de todos los datos (“frames”) recogidos para cada muestra tras eliminar aquellos que mostraban indicios de alteraciones en la proteína por efecto de la radiación.
- sustracción de la contribución del solvente.

- representaciones preliminares de Kratky, como comprobación de que la proteína está correctamente plegada, y Guinier, para verificar si los datos son lineales a bajo ángulo, lo que indica ausencia de agregados.
- extrapolación de los datos a dilución infinita para la obtención de curvas de dispersión ideal, con las que se continuó el proceso de modelado de la estructura.
- cálculo de R_g y de la intensidad dispersada a ángulo 0° (I_0), volumen de Porod y masa molecular a partir de las representaciones de Guinier y Porod. El volumen de Porod permite estimar la masa de la partícula ($M_w = V_{\text{Porod}} / 1,7$), siendo este cálculo independiente de la concentración de proteína (Porod, G., 1982).
- cálculo del diagrama de distribución de distancias para obtener R_g y D_{max} con AutoGNOM y el programa GNOM (Petoukhov *et al.*, 2007).

3.2.5.g3. Construcción de modelos 3D *ab initio* y determinación de la orientación relativa de los módulos por modelado de cuerpo rígido

El paquete ATSAS proporciona los programas necesarios para la construcción de modelos de esferas, modelado de cuerpo rígido, superposición de estructuras y cálculo de espectros teóricos de SAXS. En el modelado *ab initio* se generaron conjuntos de 10 modelos de esferas con DAMMIN (Svergun, 1999) (modos “fast” y “slow”) o DAMMIF (Franke & Svergun, 2009). En cada caso, los 10 modelos de esferas generados se superpusieron y alinearon en pares con SUPCOMB (Kozin & Svergun, 2001), descartándose los más divergentes. El modelo con menores diferencias con respecto al promedio (menor NSD) se consideró el más probable. Para intentar obtener un modelo promedio mejorado, las estructuras seleccionadas y alineadas con SUPCOMB se promediaron con DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003). El modelo promediado (archivo “damstart”) se utilizó después como punto de partida en DAMMIN para intentar generar un modelo refinado cuyo perfil de dispersión se ajustara mejor a los datos experimentales. En el modelado del dímero de SkI, se utilizaron también las opciones “sin” y “con” restricción de simetría P2. Se seleccionaron como mejores modelos aquellos cuyos perfiles teóricos

de dispersión coincidían mejor con los experimentales (menor desviación cuadrática media (χ^2)).

La orientación relativa de los módulos de Skl dentro de la estructura completa de la proteína se exploró mediante modelado de cuerpo rígido con SASREF y BUNCH (Petoukhov & Svergun, 2005), modificando la disposición relativa de los modelos a alta resolución construidos para cada uno de ellos (véase **apartado 3.2.5.h**) hasta minimizar la desviación entre el espectro teórico de SAXS, calculado para la estructura global, y el perfil experimental. Los modelos generados con SASREF/BUNCH se superpusieron automáticamente sobre la envuelta molecular generada por DAMMIN/DAMMIF con el programa SUPCOMB (Kozin & Svergun, 2001). El cálculo de los espectros de SAXS de los modelos generados se realizó con CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995). Los coeficientes de sedimentación y los radios de Stokes de los modelos de esferas se calcularon con el programa HYDRO++ (García de la Torre *et al.*, 2007) y los de los modelos a alta resolución obtenidos con SASREF, con HYDROPRO (Ortega *et al.*, 2011) (**Tabla 8.2**), con el fin de compararlos con los valores experimentales obtenidos mediante ultracentrifugación analítica.

3.2.5.h. Modelado por homología de los módulos de Skl

Los modelos estructurales del módulo catalítico (N-Skl) y el CBM (C-Skl) de Skl se construyeron mediante modelado por homología utilizando diferentes patrones estructurales.

3.2.5.h1. Búsqueda de patrones estructurales y alineamiento de secuencias

La búsqueda de patrones estructurales en las bases de datos de proteínas de estructura conocida para cada uno de los módulos de Skl se realizó con DELTA-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), utilizando un valor de 0,005 como índice de corte (E) y reteniendo solo aquellas secuencias con los mejores valores del mismo. Cuando la búsqueda de moldes basada en la secuencia dio como resultado proteínas con un porcentaje de identidad inferior al 40 % se emplearon servidores de búsqueda basados en plegamiento (Phyre, HHPred, I-TASSER) (**Tabla 8.2**) para encontrar los moldes más adecuados a cada módulo de la proteína.

El alineamiento de los patrones estructurales con la secuencia a modelar se realizó automáticamente con CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1997)

y/o MODELLER (Sali & Blundell, 1993), y se modificó manualmente, cuando se consideró necesario, teniendo en cuenta factores tales como la concordancia de la estructura secundaria de los moldes con la predicción realizada para la secuencia problema, la conservación de residuos funcionalmente importantes dentro de la familia, la distribución de zonas cargadas, etc.

La predicción de estructura secundaria se realizó de forma independiente para cada uno de los módulos utilizando tres métodos distintos: Psi-Pred (McGuffin *et al.*, 2000), J-Pred, (Cuff & Barton, 2000) y Predict-Protein (Rost *et al.*, 2004). Solamente se consideraron en la evaluación del alineamiento aquellos residuos para los que al menos dos de los métodos predijeron el mismo tipo de estructura con una fiabilidad superior al 85%.

3.2.5.h2. Construcción y validación de los modelos

Los modelos de cada módulo de SkI se generaron por separado con MODELLER (Sali & Blundell, 1993) seleccionándose los mejores en base al potencial DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) proporcionado por el programa (un potencial más negativo indica un modelo energéticamente más favorable). Los modelos se evaluaron también estereoquímicamente con el programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) y energéticamente con VERIFY3D (Bowie *et al.*, 1991; Eisenberg *et al.*, 1997; Lüthy *et al.*, 1992). Se tuvo en cuenta, además, la conservación estructural de los residuos catalíticos y otros grupos funcionalmente importantes, así como el nivel de conservación de los elementos de estructura secundaria con respecto a los resultados de los métodos de predicción basados en el análisis de la secuencia.

3.2.6. Ensayos de actividad enzimática

3.2.6.a. Actividad enzimática *in vitro* sobre paredes purificadas

Los ensayos *in vitro* para determinar la actividad específica de las enzimas purificadas se realizaron sobre paredes de neumococo (cepa R6) utilizando el procedimiento descrito por Mosser y Tomasz (1970). La mezcla de reacción contenía 10 µl de enzima a la concentración adecuada y 10 µl de paredes marcadas con [*metil*-³H] colina (60 Ci/mmol) en 240 µl de tampón PB (pH 6,8). Tras 15 min de incubación a 37 °C se detuvo la reacción con la adición de 10 µl de formaldehído (35 %, v/v),

añadiéndose también 10 μ l de BSA (4%, p/v) de forma que ésta actuase como cargo de los fragmentos de pared. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente ($12.000 \times g$, 15 min), recogiendo la mayor parte del sobrenadante ($\sim 200 \mu$ l), para determinar el grado de hidrólisis de las paredes a partir de la radiactividad liberada al medio. Tras añadir 1 ml de líquido de centelleo se midió la radiactividad (cpm) en un contador de centelleo líquido (LKB Wallac). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la solubilización de 1 μ g de pared en 10 minutos (Höltje y Tomasz, 1976). En nuestras condiciones experimentales esto corresponde a 715 cpm. La contribución de la radiactividad de fondo se eliminó realizando controles en paralelo en los que la enzima fue sustituida por tampón.

En los experimentos de conversión la mezcla de reacción se preparó y se preincubó durante 5 min a 4°C (mezcla agua-hielo), y tras 45 segundos a 43°C se incubó a 37°C durante 15 min.

Las paredes fueron proporcionadas por el Dr. Pedro García (CIB-CSIC), en cuyo laboratorio se hicieron los ensayos.

3.2.6.b. Actividad bacteriolítica y bactericida

La actividad bacteriolítica y bactericida de las enzimas purificadas se ensayó sobre suspensiones de bacterias crecidas en su medio correspondiente (**apartados 3.1.1 y 3.2.1**) hasta alcanzar la fase exponencial ($DO_{550} \cong 0,3$). Una vez alcanzadas estas condiciones se sedimentaron por centrifugación (10 min, 3.800 rpm, Eppendorf Centifuge 5810 R, rotor A-4-62) y se lavaron dos veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 1,8 mM) al pH requerido, eliminándose el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en el mismo tampón, ajustando la DO_{550} a aproximadamente 0,6, y se transfirieron a tubos de plástico (1 cm de paso óptico), manteniéndose en frío (mezcla agua/hielo). Como se muestra en la **Figura 3.5**, tras añadir la enzima en frío, las muestras se incubaron a 30 ó 37°C durante 60 minutos, monitorizando el valor de la turbidez (DO_{550}) en función del tiempo en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios Epsilon (actividad bacteriolítica), y se determinó el número de células viables tras 60 minutos de incubación (actividad bactericida). A este fin, se realizaron diluciones seriadas de una alícuota de cada muestra en PBS y se sembraron, por triplicado, 10 μ l de las mismas en placas de agar-sangre, que se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de proceder al conteo de colonias formadas, y así determinar el número de células

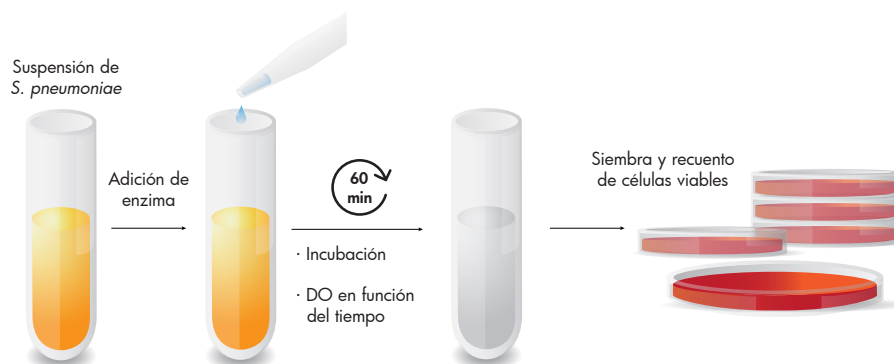


Figura 3.5. Esquema de un ensayo de actividad bacteriolítica y bactericida. Tras alcanzar la fase exponencial, las bacterias se centrifugan y resuspenden en tampón PBS al pH elegido. Se añade la enzima a la/s concentración/es seleccionadas para el ensayo y se incuba la mezcla durante 60 minutos a la temperatura elegida, registrándose el descenso en la DO_{550} , provocado por la enzima en función del tiempo. Al finalizar la incubación se siembran, por triplicado, diluciones seriadas de la muestra en placas de agar-sangre y se procede al conteo de colonias tras 24 horas a 37°C , determinando así el número de células viables (CFU/ml).

supervivientes (viables) en cada muestra (unidades formadoras de colonia o CFU/ml). En todos los casos se realizaron controles en paralelo sustituyendo la enzima ensayada por el correspondiente volumen de tampón.

Los datos mostrados en este trabajo son representativos de los resultados obtenidos en al menos tres experimentos independientes, y los valores correspondientes al número de células viables representan la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. En el caso de distribución de datos normal se eligió el análisis de la varianza (ANOVA de una vía) para comparaciones múltiples, utilizando, si existían diferencias significativas entre alguno de los grupos, el test *post hoc* LSD de Fisher (“Least Significant Difference”). En el caso de distribución de datos no normal se empleó el test U de Mann–Whitney. El análisis estadístico se realizó con el programa STATISTICA (Tabla 8.2).

3.2.6.c. Determinación de la CMI

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como aquella a partir de la cual no hay crecimiento visible de bacterias tras 24 horas de cultivo en medio Mueller-Hinton suplementado con sangre lisada de caballo entre el 2,5 y el 5%.

Las CMIs de las amidasas LytA y QSLA2 se midieron en placas multipocillo mediante el método de microdilución aprobado por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2006), usando células de *S. pneumoniae*, previamente crecidas en placas de agar-sangre. Tras preparar una suspensión de las mismas en 3 ml de medio CA-MHB-LHB (**apartado 3.1.1**) a una DO_{550} de $\cong 0,35$ (correspondiente a 1×10^8 CFU/ml), se diluyó cinco veces para añadir 5 μ l de la misma en cada pocillo, de forma que cada uno contuviera 1×10^5 CFU/100 μ l. A los pocillos se añadieron también 100 μ l de enzima a cada una de las concentraciones a ensayar y, en los casos indicados, DTT a concentración final de 0,25 mM (máxima posible sin que precipite el medio). Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando la cepa control de neumococo para ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos ATCC® 49619™ (serotipo 19F) (**Tabla 3.1**). La formación de colonias se analizó tras incubar a 37°C durante 24 horas.

3.2.7. Modelo animal de infección en embriones de peces cebrá

El modelo de infección mediante la técnica de inmersión de embriones de pez cebrá en suspensiones de bacterias ha demostrado ser eficaz en la detección de nuevos agentes antimicrobianos (ASTM E729-96, 2014; Díez-Martínez *et al.*, 2013). En este estudio hemos evaluado la capacidad de QSLA2 para proteger los embriones frente a la infección por *S. pneumoniae*. Los experimentos fueron realizados por *The Zebrafish Lab* (<http://thezebrafishlab.com>) utilizando un protocolo previamente descrito (Díez-Martínez *et al.*, 2013). Se consideró que la respuesta era positiva si se observaba un aumento en la protección de los individuos infectados estadísticamente significativa (mínimo $p \leq 0,05$) en comparación con el control positivo no tratado con enzima.

Previamente se estudió la posible toxicidad de QSLA2, utilizando 3,4-dicloroanilina como control positivo y medio E3 con y sin DTT 1 mM como control negativo. Los ensayos de toxicidad aguda se realizaron con embriones de pez cebrá incubados previamente durante 24 h a 28°C en medio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM y

MgSO₄ 0,33 mM, pH 7). La exposición a QSLA2 se mantuvo desde las 24 a las 96 horas post fecundación (hpf), añadiendo la enzima sobre cada embrión (20 embriones por cada condición, colocados individualmente en placas multipocillo), cambiándose el medio cada 24 h. El resultado del ensayo de toxicidad se consideró positivo cuando los embriones no presentaban movimiento, aunque hubiese latido del corazón, y/o alguno de los siguientes síntomas: embriones coagulados (vivos/muertos), retraso en desarrollo, malformaciones, inflamación de la cavidad cardiaca y/o hepática, falta de latido del corazón y/o sangrado en branquias y/o cavidades óticas.

Para los ensayos de infección los embriones fueron tratados con pronasa (2 mg/ml, 2 min) a las 24 hpf, para eliminar el corion, se lavaron con E3, se distribuyeron individualmente en placas multipocillo y se incubaron, en las mismas condiciones, en medio E3 que contenía 1×10^8 CFU/ml de la cepa D39 de *S. pneumoniae* vivas o muertas (control negativo de infección) por calor, durante 8 h (60 embriones para cada condición). Transcurrido el tiempo de infección, se lavaron rigurosamente los embriones y se transfirieron a una nueva placa multipocillo en la que recibieron una dosis única de proteína mediante inmersión en medio E3 suplementado con QSLA2 (+ 1 mM DTT) a las distintas concentraciones ensayadas, o el mismo volumen de tampón PB + 1 mM DTT como control negativo de la protección. A continuación se incubaron a 28°C en condiciones estériles, siguiéndose la mortalidad varias veces al día hasta los 5 días post fecundación, renovando el medio E3 cada 24 h. Los embriones se consideraron muertos cuando no se observó movimiento o cuando se daban algunas de las condiciones detalladas para los ensayos de toxicidad.

Tanto los ensayos de toxicidad como los de evaluación de QSLA2 como agente antimicrobiano se realizaron por triplicado. Los resultados del ensayo fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Dunnet como test *post-hoc*, usando GraphPad InStat v. 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

4

LA ENDOLISINA SKL

4.1

4.1.1. Reconocimiento de colina. Influencia en la estructura de Skl

El espectro de DC de las CBPs codificadas por neumococo y sus bacteriófagos es particularmente sensible a las contribuciones quirales de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos que, como se indicó en la Introducción, son el elemento determinante de la configuración espacial de los sitios de unión a colina (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003, 2005). Debido a ello, sus mínimos y máximos característicos pueden ser modificados por la unión de colina, pudiendo llegar a invertirse el signo de las bandas (Medrano *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2004; Monterroso *et al.*, 2008) . Por otro lado, la unión de colina induce la formación de dímeros en aquellas CBPs que, como Skl, tienen un CBM formado por seis repeticiones seguidas de un segmento de unos 20 aminoácidos en el extremo C-terminal (Monterroso *et al.*, 2008; Usobiaga *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2004). En LytA, la pérdida de la capacidad de dimerización lleva asociada una caída de la actividad cercana al 90 % (Varea *et al.*, 2000). Por ambos motivos hemos estudiado la unión de colina a Skl utilizando DC y ultracentrifugación analítica. Las medidas se realizaron a pH 6,5, óptimo para la actividad enzimática de Skl (Llull *et al.*, 2006).

4.1.1.a. Caracterización espectroscópica de la valoración de Skl con colina

En ausencia de colina, el espectro de DC de Skl en la región del UV-lejano muestra un mínimo en la zona de 210 nm y un máximo menos intenso centrado en torno a 230 nm (**Figura 4.1.1 A**), observado también en el espectro de Pal, la endolisina del fago Dp-1 de neumococo (Varea *et al.*, 2004). La adición de colina induce la aparición de un nuevo máximo positivo a 225 nm que altera la intensidad aparente del mínimo, desplazándolo ligeramente hacia el azul (\cong 208 nm). En el UV-cercano (**Figura 4.1.1 B**) el espectro muestra 2 máximos a 263 nm y 291 nm y dos mínimos a 287 nm y 297 nm, similares a los observados en los espectros de otras CBPs (Medrano *et al.*, 1996; Monterroso *et al.*, 2008; Varea *et al.*, 2004). La adición de colina provoca un desplazamiento de los mínimos hacia el azul y la intensidad de los mismos aumenta entre 5 - 10 veces. Los cambios observados en ambas regiones del espectro aparecen en zonas en las que predominan las contribuciones de tirosinas y triptófanos, que en el caso de Skl suponen un 22,7 % de la secuencia del módulo de unión a colina, siendo potencialmente responsables del reconocimiento del ligando alrededor del 11 % (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003, 2005). Por tanto, las variaciones en el espectro estarían reflejando modificaciones en el entorno de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos implicados directamente en la unión de colina o modificados por una posible dimerización de la proteína.

Los cambios espectroscópicos inducidos por la unión de colina se utilizaron para caracterizar su afinidad por Skl registrando los espectros a concentraciones variables de ligando. En la **Figura 4.1.2** se muestran los espectros obtenidos en el UV-lejano (panel A) y las curvas de valoración generadas al representar los cambios en la elipticidad molar por residuo (Θ) a 222 nm y 287 nm en función de la concentración de colina (paneles B y C). La unión del ligando muestra un carácter claramente bifásico, observándose un primer cambio entre 1 y 20 mM de colina en el que la variación de la intensidad del espectro es relativamente pequeña, tanto en el UV-lejano como en el UV-cercano, y da lugar a un punto isodicroico a 228 nm. A concentraciones de colina superiores a 20 mM se observa un nuevo cambio en la intensidad de las bandas que supone aproximadamente el 80 % de la variación total a las dos longitudes de onda representadas, desapareciendo, además, el punto isodicroico. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de dos clases de sitios de

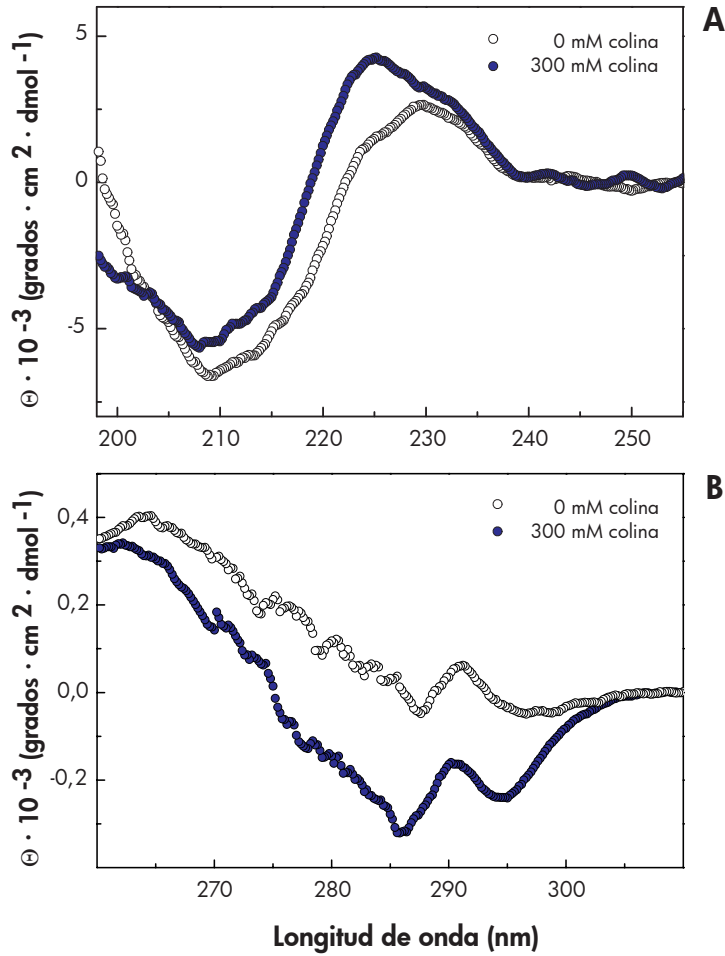


Figura 4.1.1. Espectros de dicroísmo circular de Skl. Medidas realizadas en el UV-lejano (A) y UV-cercano (B), en ausencia y en presencia de colina 300 mM. Las medidas se realizaron a 20°C en tampón PB pH 6,5, a 6 μM (UV-lejano) y 15 μM (UV-cercano) de Skl.

unión con diferente afinidad hacia colina en el CBM de Skl. El análisis de las curvas de valoración en términos de la ecuación de Hill para dos clases independientes de sitios de unión (**apartado 3.2.5.d2** en Materiales y Métodos) permitió estimar los valores de las constantes aparentes de disociación ($K_{0,5 \text{ app}}^1 \cong 1\text{-}5 \text{ mM}$; $K_{0,5 \text{ app}}^2 = 96 \pm 3 \text{ mM}$) y sus respectivos índices de Hill ($n_H^1 \cong 1$ y $n_H^2 = 3,0 \pm 0,3$).

RESULTADOS

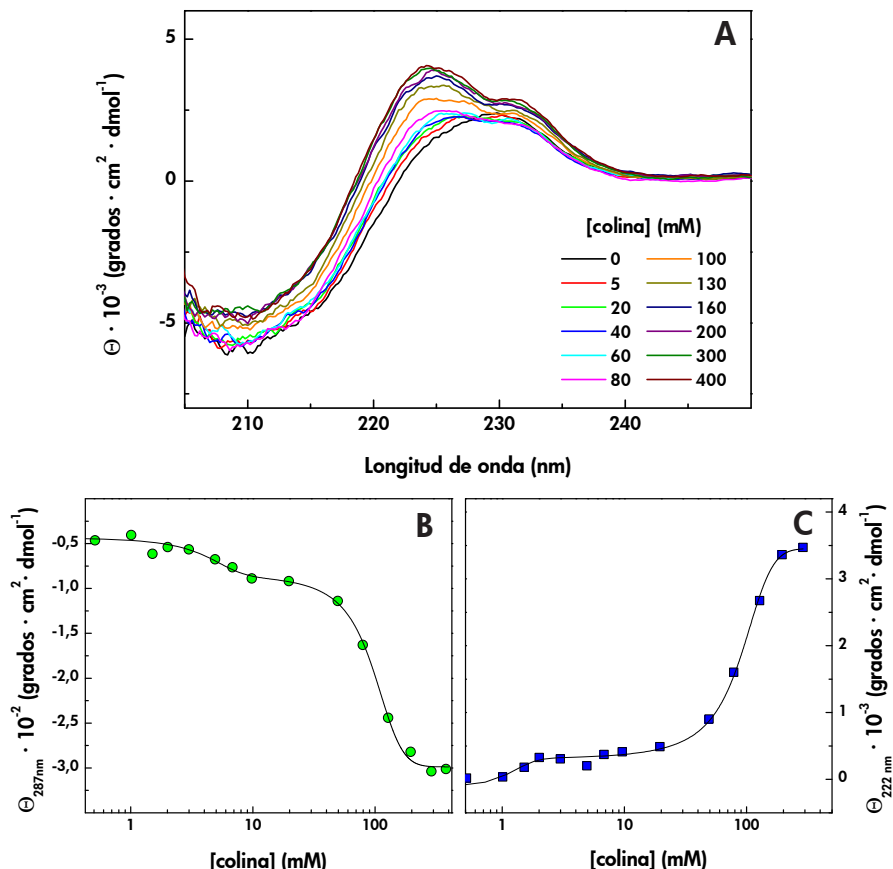


Figura 4.1.2. Valoración de Skl con colina. (A) Variación del espectro de DC (UV-lejano) en función de la concentración de colina. (B) y (C) Dependencia de la elipticidad molar por residuo con el logaritmo de la concentración de colina a 287 nm (Skl 15 μM) y 222 nm (Skl 22 μM). Las líneas continuas muestran el ajuste de la ecuación de Hill para un sistema con dos clases de sitios de unión independientes con los parámetros indicados en el texto. Los experimentos se realizaron a 20°C en tampón PB (pH 6,5).

Al igual que Skl, la autolisina LytA y la endolisina Pal contienen dos tipos diferentes de sitios de unión, pero su afinidad global por colina es significativamente superior, con valores de $0,63 \pm 0,05 \text{ mM}$ ($K_{0,5 \text{ app}}^1$) y $6,5 \pm 0,3 \text{ mM}$ ($K_{0,5 \text{ app}}^2$) en LytA (Medrano *et al.*, 1996), y en torno a 8 y 10 mM ($K_{0,5 \text{ app}}^1$ y $K_{0,5 \text{ app}}^2$) en Pal (Varea *et al.*, 2004). Por el contrario, las curvas de valoración de las endolisinas Ejl (amidasa) y Cpl-1 (lisozima) son

monofásicas, lo que indicaría una sola clase de sitios de unión cuyas afinidades son del orden de las estimadas para los sitios de mayor afinidad de Skl: $K_{0,5 \text{ app}} = 1,83 \pm 0,02 \text{ mM}$ en Ejl (Sáiz *et al.*, 2002) y $3,6 \pm 0,2 \text{ mM}$ en Cpl-1 (Monterroso *et al.*, 2008). Estas diferencias en afinidad eran, a priori, difíciles de predecir, teniendo en cuenta la elevada conservación de secuencia de los respectivos CBMs y que los residuos potencialmente implicados en la unión a colina están prácticamente conservados en todas ellas. A pesar de ello, y como se detalló en la Introducción, la estructura cristalográfica de Cpl-1 muestra que, de los cinco sitios canónicos posibles atendiendo a la secuencia, solo dos o tres son funcionales debido a un cambio en la estructura global del CBM y/o impedimentos estéricos (Hermoso *et al.*, 2003), mientras que en LytA posiblemente lo son todos (Li *et al.*, 2015; Mellroth *et al.*, 2014).

4.1.1.b. Estructura cuaternaria de Skl. Dependencia de la unión a colina.

El estado de asociación de Skl en ausencia y en presencia de colina se estudió mediante ultracentrifugación analítica. El carácter mono- o polidisperso de las soluciones de proteína se analizó, en primer lugar, por velocidad de sedimentación, una técnica que permite además caracterizar el comportamiento hidrodinámico de la molécula. La distribución de coeficientes de sedimentación obtenida a partir del análisis de los perfiles de sedimentación en ausencia de colina muestra una especie mayoritaria ($> 90\%$) cuyo coeficiente de sedimentación ($s_{20,w} = 2,85 \pm 0,06 \text{ S}$) es compatible con una masa molecular de 34,2 kDa. Aparece además un pequeño pico ($\cong 4\%$ a $6 \mu\text{M}$ de Skl) con un coeficiente de sedimentación en torno a 4,8 S, atribuible a especies de mayor masa molecular (**Figura 4.1.3**). En presencia de colina el valor del coeficiente de sedimentación de la especie mayoritaria aumenta hasta $3,73 \pm 0,01 \text{ S}$ a pH 8,0, compatible con la formación de un dímero, observándose también una pequeña fracción de muestra ($\leq 10\%$ a $6 \mu\text{M}$ de proteína) con un coeficiente de 5,8 S, ligeramente superior al de la especie de mayor tamaño detectada en la proteína libre. La forma y posición del máximo de la función de distribución de $s_{20,w}$ obtenida a distintos valores de pH sugiere que la formación del dímero estaría ligeramente desfavorecida por debajo de pH 7,0 (**Figura 4.1.3** y **Tabla 4.1.1**). En la **Tabla 4.1.1** se muestran los coeficientes de sedimentación de Skl libre y unida a colina, normalizados a las condiciones en agua a 20°C ($s_{20,w}$), junto con la relación entre el coeficiente de fricción traslacional de Skl (f) y el correspondiente a una

RESULTADOS

esfera rígida anhidra que sedimentase como Skl (f_0), y el radio de Stokes de la partícula hidratada (R_s). Los valores de f/f_0 son superiores a los esperados para una partícula globular rígida, particularmente en el dímero, lo que sugiere que tanto el monómero como el dímero de Skl presentan estructuras alargadas y que la dimerización aumenta significativamente la longitud de la partícula, al igual que ocurre en otras CBPs de estructura conocida (Buey *et al.*, 2007; Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2015; Mellroth *et al.*, 2014). El incremento en el valor de R_s también confirma que la dimerización no tiene lugar por asociación lateral de los monómeros.

Tabla 4.1.1. Parámetros hidrodinámicos, en distintos solventes, de la especie mayoritaria de Skl en ausencia y en presencia de colina. $s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación normalizado a las condiciones del agua a 20 °C; f/f_0 , relación entre coeficientes de fricción de Skl y el de la esfera rígida anhidra equivalente; R_s , radio de Stokes.

	Colina (mM)	$s_{20,w}$ (S)	f/f_0^a	R_s^a (Å)
Tris 50 mM, pH 8,0	0	2,93	1,31	28,8
	300	3,74	1,61	44,0
Tris 50 mM, pH 8,0 1 mM β -mercaptoetanol	0	2,92	1,30	28,2
	300	3,72	1,63	44,4
PB, pH 8,0 1 mM β -mercaptoetanol	0	2,82	1,35	29,2
	300	3,74	1,61	44,0
PB, pH 7,0 1 mM β -mercaptoetanol	0	2,80	1,36	29,4
	300	3,66	1,65	45,0
PB, pH 6,5	0	2,79	1,34	29,0
	100	2,84	ND	ND
	300	3,34	ND	ND

^a Los valores de f/f_0 y R_s se calcularon a partir del coeficiente de sedimentación y la masa de la partícula con el programa SEDNTERP utilizando la aproximación de Teller y el coeficiente de hidratación de la partícula ($\delta_w = 0,4099$ g agua/g proteína) calculado a partir de la composición de aminoácidos (Kuntz, 1971).

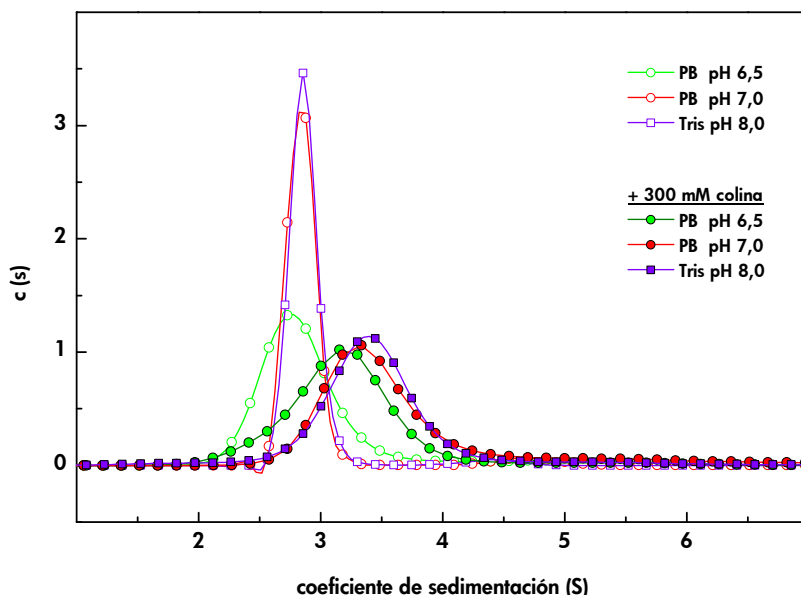


Figura 4.1.3. Distribución de los coeficientes de sedimentación de Skl en ausencia y en presencia de 300 mM colina en distintos tampones. Las medidas se realizaron a 20 °C, 45,000 rpm y 6 μ M de proteína.

La formación de dímeros se verificó realizando experimentos de equilibrio de sedimentación a diferentes concentraciones de colina; en la **Figura 4.1.4** se muestra la variación de la masa molecular aparente con respecto a la masa del monómero ($M_{w,app}/M_0$) a dos valores de pH distintos. Tanto en ausencia de colina como a concentraciones de ligando inferiores a 100 mM, los perfiles de sedimentación se ajustan al modelo ideal para una especie única cuya masa molecular aparente (36 ± 4 kDa) corresponde a la del monómero ($M_{w,app}/M_0 = 1,1 \pm 0,1$; media de 14 experimentos). A mayor concentración de colina el valor de $M_{w,app}/M_0$ aumenta, alcanzando valores próximos a los esperados para el dímero ($M_{w,app}/M_0 \cong 2,0 \pm 0,1$) a concentraciones de ligando iguales o superiores a 300 mM en tampón Tris 50 mM, pH 8,0. A igual concentración de colina las masas promedio relativas obtenidas eran más bajas en tampón PB a pH 6,5, de acuerdo con lo mostrado en la **Figura 4.1.3**.

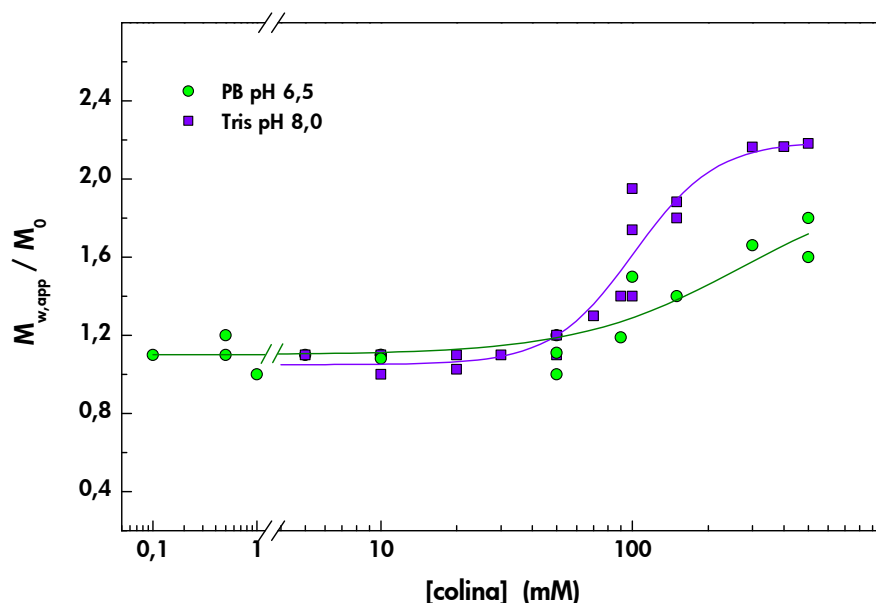


Figura 4.1.4. Dependencia de la masa molecular promedio relativa ($M_{w,app}/M_0$) de Skl con la concentración de colina. Las medidas se realizaron a Skl 6 μ M y 20°C, utilizando hasta tres velocidades distintas.

El intervalo de concentraciones de colina en el que tiene lugar la formación del dímero coincide con el de saturación de los sitios de más baja afinidad en la valoración realizada por DC (véase **Figura 4.1.2**), lo que sugiere que la dimerización de Skl es inducida por la unión de colina a los mismos. Este comportamiento es similar al de la amidasa Pal (Varea *et al.*, 2004), aunque en esta endolisina la saturación de los sitios de baja afinidad y la dimerización tienen lugar a concentraciones de colina 10 veces menores. Por el contrario, en LytA, la dimerización está ligada a la saturación de los sitios de mayor afinidad y la proteína es parcialmente dimérica en ausencia de ligando (Usobiaga *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2000).

4.1.2. Estabilidad térmica y organización modular de Skl. Influencia del pH y la unión de colina

El estudio del efecto de la unión de colina en la estructura de Skl se complementó caracterizando la estabilidad térmica de la proteína nativa y su dependencia del pH por DC y DSC.

4.1.2.a. Análisis espectroscópico: DC

La desnaturalización térmica de Skl se siguió registrando los cambios inducidos por el aumento de la temperatura en el espectro de DC (UV-lejano) y la variación de la elipticidad a 225 nm (longitud de onda de máxima variación) al calentar la muestra a velocidad constante. Como se puede ver en la **Figura 4.1.5 A**, la pérdida del máximo centrado a 230 nm, característico de la estructura nativa del módulo catalítico, se produce entre 40°C y 60°C a pH 6,5. A partir de esa temperatura apenas hay cambios en el espectro, y la forma del mismo (con un mínimo alrededor de 215 nm) sugiere la existencia de estructura residual en la proteína desnaturalizada, posiblemente de tipo β (Medrano *et al.*, 1996; Sáiz *et al.*, 2002; Varea *et al.*, 2000). El proceso es, además, irreversible, ya que el espectro de la proteína nativa no se recupera al volver a enfriar la muestra a 20°C, manteniéndose igual que el obtenido a 90°C (datos no mostrados).

La estabilidad de Skl disminuye al aumentar la acidez del medio (**Figura 4.1.5 B**). Así, a pH 5,5, la desnaturalización comienza por debajo de 40°C y la proteína comienza a precipitar por encima de 45°C, dando lugar a una disminución generalizada de la intensidad del espectro (datos no mostrados). El aumento del pH produce un desplazamiento de la transición hacia temperaturas más altas, estabilizándose el efecto en torno a pH 7,0. A partir de pH 6,0 desaparece, además, la precipitación de Skl. En la **Tabla 4.1.2** se muestran las temperaturas medias de transición ($T_{1/2}$) obtenidas del ajuste de los perfiles de desnaturalización mostrados en la **Figura 4.1.5 B** a una sigmoide, según se indica en Materiales y Métodos (**apartado 3.2.5.d3**).

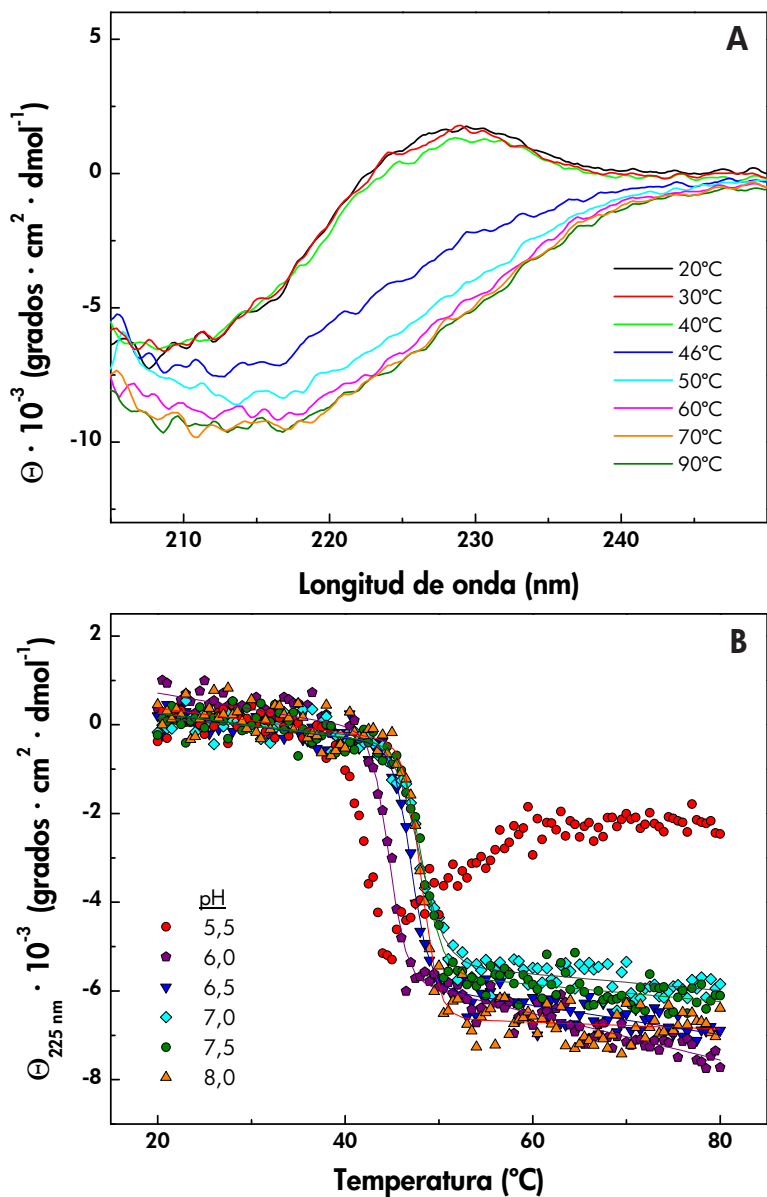


Figura 4.1.5. Caracterización espectroscópica de la estabilidad térmica de Skl. (A) Dependencia con la temperatura del espectro de DC en el UV-lejano a pH 6,5. (B) Perfiles de desnaturalización térmica registrados a 225 nm a distintos pHs. Las medidas se realizaron en tampón PB al pH indicado en la figura, utilizando una velocidad de calentamiento de 30°C/h y una concentración de proteína de 4,8 μM .

Tabla 4.1.2. Influencia del pH sobre la $T_{1/2}$ del perfil de desnaturalización de Skl obtenido a 225 nm^a

pH	$T_{1/2}$ (°C)
5,5	~ 42,4
6,0	44,63 ± 0,09
6,5	47,05 ± 0,09
7,0	47,9 ± 0,1
7,5	48,2 ± 0,1
8,0	48,1 ± 0,1

^a Condiciones experimentales de la **Figura 4.1.5 B**.

Como se mostró en el **apartado 4.1.1.b**, la unión de colina a Skl induce también un cambio en la estructura cuaternaria de la proteína y ambos procesos pueden contribuir a estabilizar la estructura nativa. En la **Figura 4.1.6** se muestran los perfiles de desnaturalización obtenidos a pH 7,5 (máxima estabilidad) a concentraciones crecientes de colina. La unión del ligando induce un incremento de la $T_{1/2}$ de unos 4°C a 20 mM colina y de casi 13°C en presencia de colina 300 mM (**Tabla 4.1.3**). Las curvas son aparentemente monofásicas, lo que podría indicar que la desnaturalización del módulo catalítico y del CBM tiene lugar de forma simultánea o, alternativamente, que la variación de la elipticidad a 225 nm refleja mayoritariamente la desnaturalización del CBM debido a la fuerte contribución de los residuos aromáticos del mismo en esta región del espectro (**Figura 4.1.1 A**). Al igual que en la proteína libre, la desnaturalización de los complejos Skl/colina es irreversible.

Tabla 4.1.3. Dependencia del perfil de desnaturalización térmica de Skl a 225 nm con la concentración de colina^a

colina (mM)	$T_{1/2}$ (°C)	
	pH 6,5	pH 7,5
0	47,05 ± 0,09	48,7 ± 0,1
20	47,05 ± 0,09	52,9 ± 0,1
100	53,54 ± 0,06	56,62 ± 0,08
300	—	61,48 ± 0,06

^a Medidas realizadas a 225 nm en tampón PB a 11,9 μM de proteína (velocidad de calentamiento de 40°C/h).

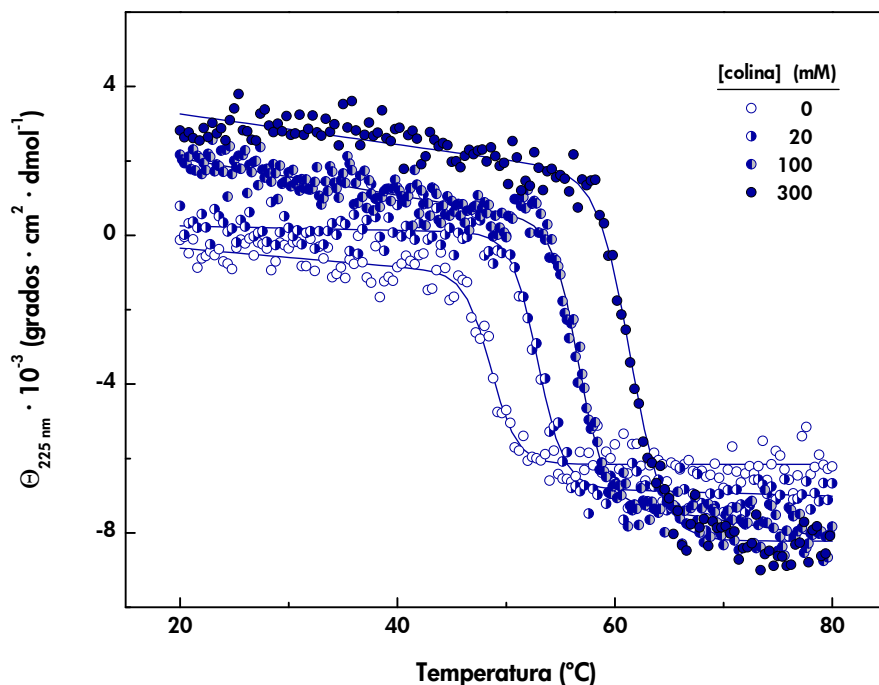


Figura 4.1.6. Dependencia de la estabilidad térmica de SkI con la concentración de colina. Variación de la elipticidad molar promedio por residuo a 225 nm en ausencia y en presencia de colina a las concentraciones indicadas en la figura. Los barridos se realizaron a 4,8 μM SkI en tampón PB (pH 7,5) con una velocidad de calentamiento de 40 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$.

4.1.2.b. Calorimetría diferencial de barrido

Para completar el estudio de la estabilidad térmica de SkI e intentar establecer el origen del carácter monofásico de los perfiles espectroscópicos, se caracterizó su desnaturalización térmica mediante DSC a pH 7,5. En la **Figura 4.1.7** se muestran los perfiles calorimétricos obtenidos en ausencia y en presencia de 100 mM colina a dos velocidades de barrido diferentes. En ambos casos se observa un pico asimétrico que se desplaza ligeramente hacia temperaturas más altas al aumentar la velocidad de calentamiento. En ausencia de colina, la desnaturalización tiene lugar con una variación de entalpía de 147 ± 10 kcal/mol y una temperatura de transición (T_m) muy próxima a la $T_{1/2}$ del correspondiente perfil de DC.

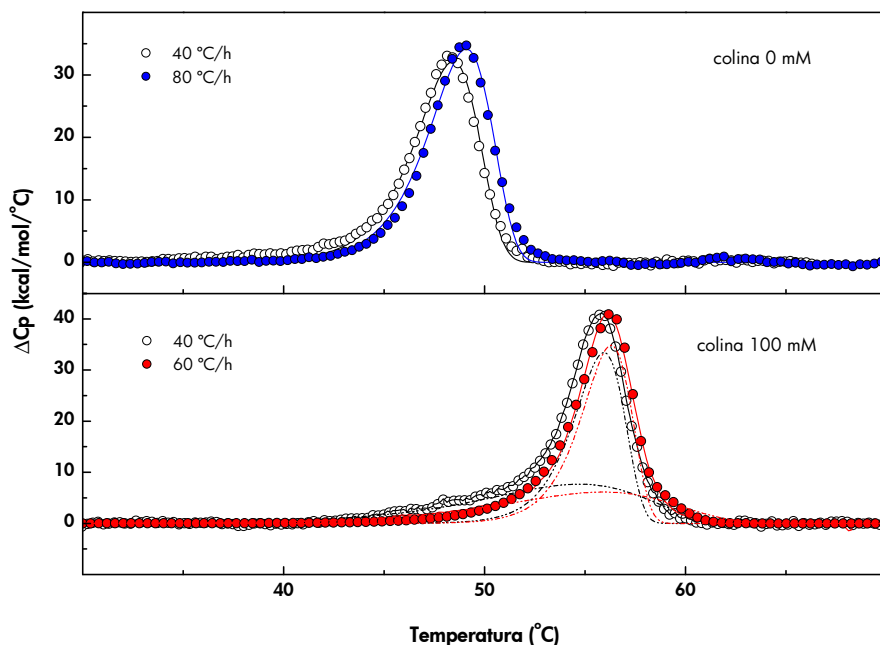


Figura 4.1.7. Influencia de la velocidad de barrido en los termogramas de Skl registrados en ausencia y en presencia de colina 100 mM. Las medidas se realizaron a 40 (○), 60 (●) y 80 °C/h (●) en tampón PB (pH 7,5) a 9 μM de proteína. Las curvas continuas muestran el ajuste teórico de los datos experimentales (símbolos) al modelo indicado en el texto y las curvas discontinuas las componentes bajo la envolvente experimental en presencia de colina 100 mM.

La forma y la posición del máximo de los perfiles experimentales pueden describirse asumiendo un modelo irreversible entre dos estados ($N \rightarrow I$), lo que indica que la desnaturalización está controlada cinéticamente y que ambos módulos se comportan como un único bloque cooperativo. Esta conducta es característica de proteínas formadas por módulos o dominios que interaccionan fuertemente entre sí y ha sido observada previamente en la amidasa Pal (Varea *et al.*, 2004) y en la lisozima Cpl-1 a determinadas concentraciones de colina (Monterroso *et al.*, 2008).

La unión a colina desplaza tanto la posición del máximo como el comienzo de la transición y aumenta la asimetría de los termogramas. La entalpía de desnaturalización aumenta también hasta valores medios de 187 kcal/mol, y el perfil de desnaturalización pasa a ser compatible

RESULTADOS

con la existencia de dos procesos irreversibles entre dos estados bajo la envolvente, como se muestra en la **Figura 4.1.7**. Este comportamiento sugiere que, aunque la unión de colina podría estabilizar al módulo catalítico a través de la interacción de éste con el CBM (la desnaturalización de Skl comienza a temperaturas más altas), el reconocimiento del ligando podría bien modificar la interacción entre dominios o bien minimizar su efecto sobre el proceso de desnaturalización, al aumentar la diferencia entre el valor de la T_m de cada módulo (Monterroso *et al.*, 2008; Varea *et al.*, 2004).

En la **Tabla 4.1.4** se muestran los valores experimentales obtenidos para la entalpía total de desnaturalización (ΔH_{cal}) y la temperatura de transición (T_m) en las distintas condiciones experimentales ensayadas, así como los parámetros obtenidos del análisis de las curvas experimentales en términos de una transición (Skl libre) o dos transiciones (complejo Skl/colina) irreversibles entre dos estados.

Tabla 4.1.4. Dependencia de los parámetros de desnaturalización térmica de Skl con la velocidad de barrido y la unión a colina a pH 7,5^a.

[colina] (mM)	v (°C/h)	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	E_a^f (kcal/mol)	ΔH^f (kcal/mol)	T_m^f (°C)
0	40	48,29±0,02	146±9	132±4	137±5	48,4±0,1
0	80	48,92±0,01	147±10	133±1	144±1	49,10±0,04
100	40	55,81±0,01	189±9	53±2 (1) 173±2 (2)	84±2 (1) ^b 113±4 (2)	54,71±0,07 (1) 55,94±0,01 (2)
100	60	56,11±0,06	189±9	65±10 (1) 184±10 (2)	74±4 (1) 105±11 (2)	56,2±0,2 (1) 56,30±0,01 (2)

^a v es la velocidad de calentamiento, T_m la posición del máximo en la curva experimental, ΔH_{cal} la entalpía de desnaturalización medida por DSC, y E_a^f , ΔH^f y T_m^f la energía de activación, la entalpía de desnaturalización y la temperatura de transición, estimadas a partir del análisis de los datos experimentales como uno o dos procesos irreversibles entre dos estados. ^b Los valores (1) y (2) corresponden a la primera y segunda transición, respectivamente.

4.1.3. Caracterización de la estructura 3D de Skl

4.1.3.a. Modelado del módulo catalítico. Residuos implicados en la catálisis

Como se indicó en la introducción, Skl es una N-acetilmuramoil-L-alanil amidasa cuyo módulo catalítico (N-Skl) pertenece a la familia CHAP (cisteína-histidina amidohidrolasa/peptidasa; PF05257) y el alineamiento de su secuencia con las de otras proteínas de la familia señala a la Cys31 y la His92 como posibles residuos catalíticos (véase alineamiento de familia en el Anexo, **Figura 8.1**). La predicción de estructura secundaria (programas Psi-Pred, J-Pred, PredictProtein; **Tabla 8.2**) indica, además, que N-Skl contendría tres hélices- α y seis hebras- β , con una pequeña hebra adicional formada por los aminoácidos 20 y 21 (**Figura 4.1.8**). Según estas predicciones, la cisteína catalítica estaría en el extremo amino terminal de la segunda hélice- α , y la histidina catalítica en el extremo amino terminal de la tercera hebra- β .

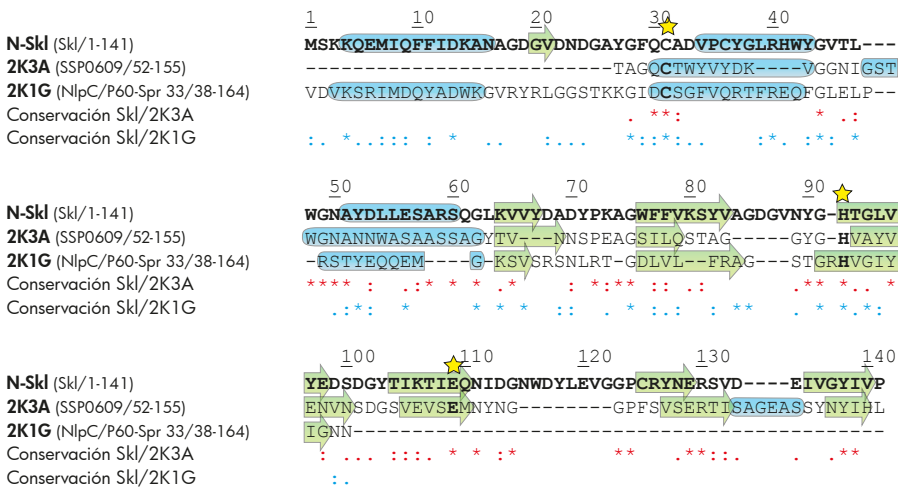


Figura 4.1.8. Alineamiento de N-Skl con los moldes utilizados para la construcción del modelo 3D (PDB: 2K3A y 2K1G) y distribución de los elementos de estructura secundaria. Los cilindros azules (hélices- α) y las flechas verdes (hebras- β) indican la distribución de elementos de estructura secundaria en los moldes y en la predicción realizada para N-Skl. Las estrellas amarillas señalan la posición de los aminoácidos catalíticos en los moldes y sus equivalentes en Skl (numeración según la secuencia de Skl). Los símbolos en rojo y en azul muestran la identidad (*), sustituciones conservativas (:) y semi-conservativas (:) con 2K3A y 2K1G, respectivamente (entre paréntesis, nombre y número de aminoácidos de cada proteína).

La búsqueda con DELTA-BLAST de proteínas de estructura conocida que pudieran ser utilizadas como molde en la construcción de un modelo por homología de N-Skl no permitió identificar patrones estructurales con más de un 19-24% de identidad de secuencia y con buena cobertura de la secuencia, por lo que se utilizaron también métodos de reconocimiento del plegamiento (Phyre2, HHPred, I-TASSER; **Tabla 8.2**). Ambas aproximaciones identificaron al dominio CHAP de la proteína SSP0609 (código Uniprot: Q49ZM2_STAS1) (Rossi *et al.*, 2009), procedente de *Staphylococcus saprophyticus* (código PDB: 2K3A), como el mejor patrón posible para la mayor parte de la secuencia de N-Skl (23,6% identidad y 81% de cobertura: residuos 27 al 141 de Skl). Con este molde, el extremo N-terminal de N-Skl (residuos 1-26), que según la predicción contendría una hélice- α , quedaba sin modelar. Se identificó como mejor molde para la primera parte de la proteína, por el mismo procedimiento, a la estructura del dominio NlpC/P60 de la lipoproteína Spr 33 de *E. coli* (código Uniprot: MEPS_ECOLI; código PDB: 2K1G) (Aramini *et al.*, 2008), una cisteín-peptidasa que presenta un plegamiento tipo papaína (18% identidad y 71% de cobertura para los residuos 3 a 98 de Skl). El alineamiento simultáneo de las secuencias obtenido con MODELLER (**Tabla 8.2**) se modificó manualmente basándose en la comparación de los elementos de estructura secundaria predichos para N-Skl con la distribución de estructura secundaria en los moldes utilizados, y en el alineamiento de secuencias dentro de la familia CHAP. Se generaron así varios alineamientos que diferían fundamentalmente en las posiciones de los “gaps” o huecos introducidos en los alineamientos de secuencia para intentar mejorar la concordancia de los elementos de estructura secundaria entre los moldes y el modelo. Para cada alineamiento se construyeron veinte modelos con MODELLER, empleando simultáneamente las regiones seleccionadas de los dos moldes. De los tres mejores modelos obtenidos en base al potencial DOPE suministrado por MODELLER, el que presentaba mejores valores en la validación energética (Procheck) y energética (VERIFY3D) y mejor correlación en la distribución de estructura secundaria y residuos relevantes fue el generado con el alineamiento mostrado en la **Figura 4.1.8**. En la **Figura 4.1.9** se muestra la estructura del modelo comparada con la de los moldes.

El modelo final generado tiene seis hebras- β que, como en SSP0609, forman una lámina- β antiparalela, flanqueada en N-Skl por tres hélices- α (carece de la hélice- α situada entre las hebras β 5 y β 6 de SSP0609).

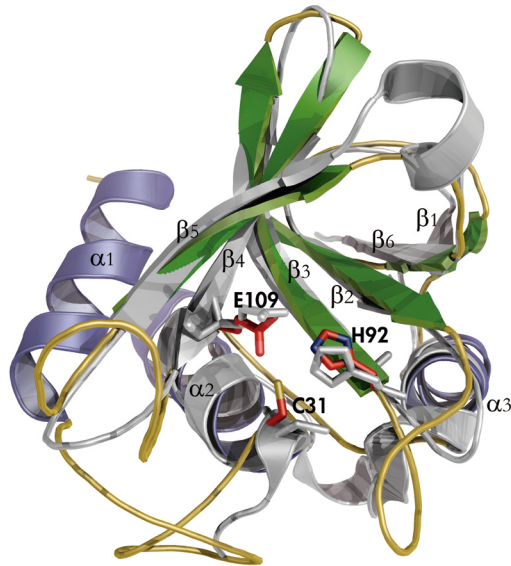
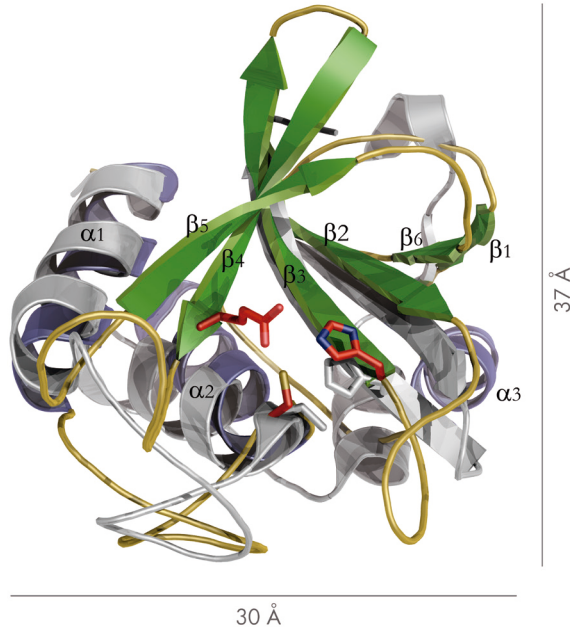
A**B**

Figura 4.1.9. Superposición del modelo 3D de N-Skl con los moldes utilizados. (A) Superposición del modelo de N-Skl generado con el alineamiento mostrado en la **Figura 4.1.8** (hélices- α en azul, hebras- β en verde y lazos en amarillo) con el molde 2K3A (en gris). (B) Superposición con la región de 2K1G (en gris) empleada para completar el modelado del extremo N-terminal del modelo de N-Skl, representado con el mismo código de colores que en (A). En ambos casos se muestran las cadenas laterales de los residuos catalíticos utilizando el modelo de varillas (carbono en rojo, nitrógeno en azul y azufre en amarillo en N-Skl, y en gris para los moldes).

RESULTADOS

El plegamiento que presenta es característico del clan CA de la superfamilia de las cisteína-peptidasas (Barrett & Rawlings, 1996).

La posible cisteína catalítica (Cys31) está situada en el extremo amino terminal de la segunda hélice- α (α_2) visible en el modelo, y la histidina conservada (His92) en el extremo amino terminal de la tercera hebra- β (β_3), coincidiendo con las predicciones de estructura secundaria. Además, la hebra β_4 contiene, en su extremo carboxilo terminal, un residuo polar conservado (Glu109 en Skl), cuya posición sugiere que podría estar implicado en la correcta orientación de la His92, formando lo que podría considerarse como una triada catalítica (Aramini *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2009; Sokabe *et al.*, 2002). Estos residuos (Cys, His y residuo polar) se encuentran conservados en los moldes, según se muestra en el alineamiento de la **Figura 4.1.8** y en la **Figura 4.1.9**.

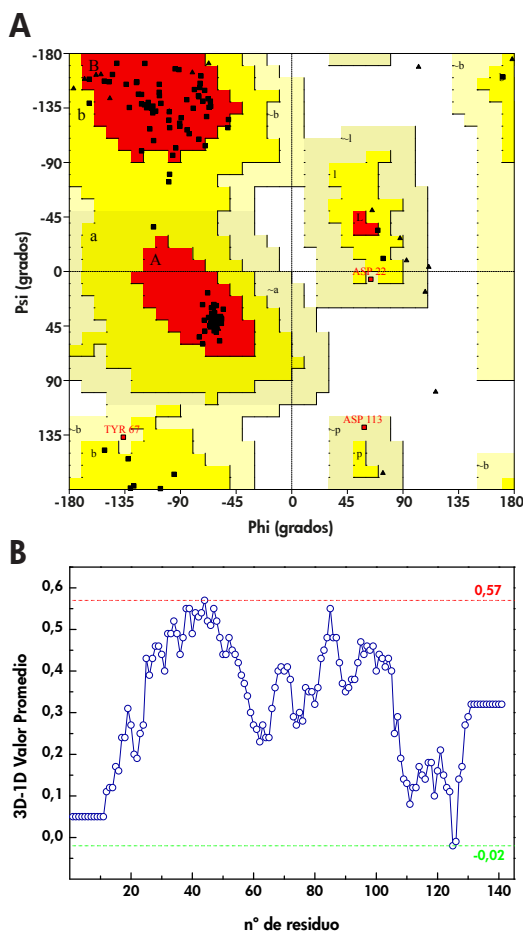


Figura 4.1.10. Evaluación estereoquímica y energética del modelo de N-Skl.

(A) Representación de Ramachandran. En rojo, regiones permitidas (86,4 %); amarillo, regiones adicionales permitidas (11 %); crema, regiones generosamente permitidas (2,5 %); blanco, regiones prohibidas. Los residuos de glicina se representan como triángulos y el resto como cuadrados. Los residuos Asp22 y Asp113 se encuentran en zonas correspondientes a lazos en el modelo, y el residuo Tyr67 está al final de la primera hebra- β . (B) Perfil energético mostrando el valor promedio de la energía por residuo, calculado con VERIFY-3D. Los trazos rojo y verde representan los valores máximo y mínimo obtenidos, respectivamente.

Según el mapa de Ramachandran (**Figura 4.1.10 A**) calculado con Procheck (**Tabla 8.2**), el modelo final seleccionado no tiene residuos en zonas no permitidas (el molde principal, 2K3A, tiene dos residuos en regiones no permitidas y el molde 2K1G sólo tiene un residuo dichas zonas, si bien éstos se encuentran en lazos/bucles en ambas estructuras). El análisis de los moldes y el modelo para comparar la compatibilidad de la estructura 3D con la secuencia de aminoácidos (VERIFY-3D, **Tabla 8.2**) muestra el valor promedio máximo de la puntuación (0,57) (**Figura 4.1.10 B**), que es algo inferior a los de los moldes (2K3A: 0,73; 2K1G: 0,77).

4.1.3.a1. Construcción, aislamiento y caracterización de mutantes del centro activo

La implicación en la catálisis de los aminoácidos identificados "*in silico*" como posible triada catalítica de Skl, (Cys31, His92 y Glu109) se estudió por mutagénesis dirigida. Para ello se sintetizaron tres genes donde los codones que codificaban para estos aminoácidos fueron modificados para sustituirlos, individualmente, por alanina. Estas construcciones se subclonaron en el vector pT7-7 para la expresión y posterior purificación de las proteínas mutantes (Skl-C31A, Skl-H92A y Skl-E109A) según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (**sección 3.2.4.b**). El nivel de expresión de los tres mutantes era elevado, pero solamente las variantes C31A y H92A pudieron purificarse a homogeneidad por cromatografía de afinidad en DEAE-celulosa con buen rendimiento ($\cong 18$ mg/litro de cultivo). En contra de lo esperado, el nivel de retención del mutante E109A en la columna de afinidad era muy bajo y la proteína eluída con colina de la columna ($\cong 2,6$ mg/litro de cultivo) formaba agregados y era poco estable, como se detallará más adelante.

La masa molecular de los mutantes C31A y H92A y la homogeneidad de las muestras obtenidas tras la purificación se comprobó mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas, correspondiendo tanto la movilidad electroforética como la relación masa/carga a los valores esperados a partir de la secuencia de aminoácidos (datos no mostrados). Los ensayos de actividad sobre paredes marcadas radiactivamente mostraban una caída drástica en la actividad específica, hasta valores del 2% con respecto a la enzima silvestre para el mutante H92A, y del 7% para el mutante C31A. Para verificar que la inactivación era debida a la implicación del residuo mutado en la catálisis y no a cambios estructurales derivados de

RESULTADOS

la mutación, se comprobó la conservación de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria mediante DC (UV-lejano y cercano) y ultracentrifugación analítica.

Los espectros de DC de los mutantes muestran pequeñas variaciones con respecto a los de Skl silvestre, y los cambios inducidos por la unión de colina son comparables a los observados para la enzima silvestre (**Figura 4.1.11 A y B**). Lo mismo ocurre con los perfiles de desnaturalización térmica registrados a 222 nm (**Figura 4.1.11 C y Tabla 4.1.5**), aunque en presencia de colina 300 mM se observa una pérdida de la señal hacia el final de la transición en el caso de los mutantes, consecuencia de su precipitación tras la desnaturalización.

Las mutaciones introducidas (C31A y H92A) tampoco modificaban significativamente la estructura cuaternaria de la proteína, ni los cambios en la misma derivados de la unión de colina (**Figura 4.1.12; Tabla 4.1.6**).

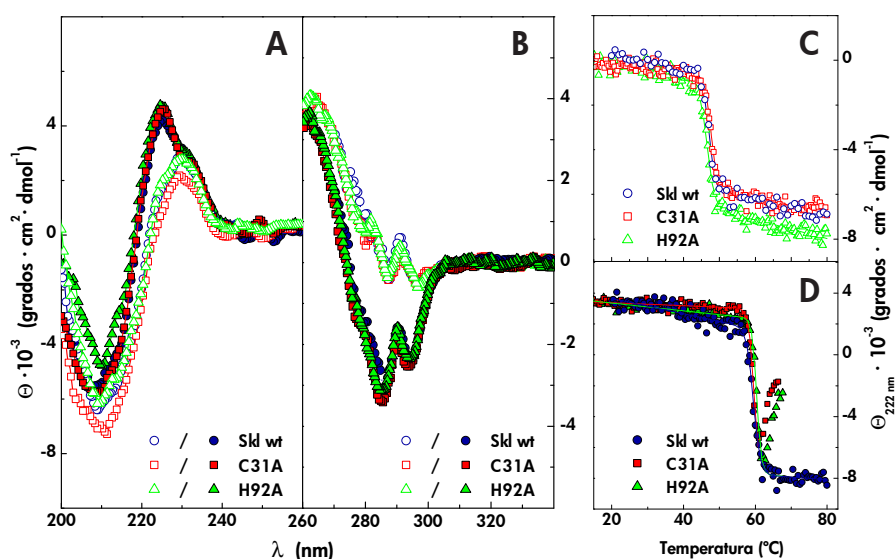


Figura 4.1.11. Comparación de los espectros de DC y la estabilidad térmica de Skl silvestre (Skl wt) y los mutantes C31A y H92A. Los espectros en el UV-lejano (A) y cercano (B) se obtuvieron a 20 °C en ausencia (símbolos abiertos) y en presencia de colina 300 mM (símbolos cerrados) a 4,8 μ M y 15 μ M de proteína, respectivamente. Los perfiles de desnaturalización térmica se registraron a 222 nm en ausencia (C) y en presencia (D) de colina 300 mM, utilizando una velocidad de calentamiento de 30 °C/h (15 μ M de proteína). Todas las medidas se realizaron en tampón PB a pH 6,5.

Tabla 4.1.5. Valores de $T_{1/2}$ de desnaturalización de Skl silvestre y los mutantes C31A y H92A en ausencia y en presencia de colina 300 mM.

Proteína	$T_{1/2}$ (°C) ^a	
	tampón PB	300 mM colina
Skl wt	47,05 ± 0,09	59,48 ± 0,08
C31A	47,65 ± 0,06	~ 59,6 ^b
H92A	46,58 ± 0,06	~ 60,4 ^b

^a Datos obtenidos del ajuste de una sigmoide a los perfiles de desnaturalización obtenidos a 222 nm (**Figura 4.1.11 C y D**).

^b Valores estimados asumiendo que la variación total de Θ_{222nm} es igual a la de Skl wt.

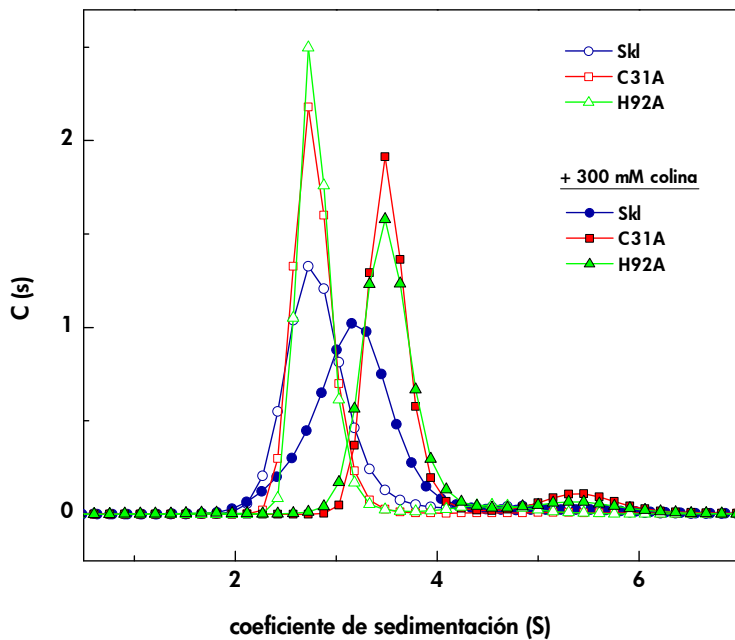


Figura 4.1.12. Distribución de los coeficientes de sedimentación de Skl silvestre y los mutantes C31A y H92A en ausencia y en presencia de colina. Medidas realizadas a 20 °C y 45.000 rpm en tampón PB, pH 6,5 (5,5 μ M de proteína).

RESULTADOS

Al igual que en Skl silvestre, la forma predominante de los mutantes en ausencia de ligando es un monómero ($s_{20,w}=2,74$ S) que dimeriza ($s_{20,w}=3,72$ S) a concentraciones saturantes de colina, aunque los perfiles de sedimentación parecen indicar una mayor tendencia a la dimerización de los mutantes, al menos a pH 6,5. La desviación de las masas promedio relativas de los mutantes con respecto al valor esperado para el monómero en ausencia de colina, o para el dímero en presencia de 300 mM de colina, podría deberse a la presencia de una pequeña fracción de agregados. Estos resultados permiten asumir que la pérdida de actividad derivada de la mutación de los residuos Cys31 o His92 es consecuencia de su participación en la catálisis. En el caso del mutante E109A, por el contrario, el espectro característico de la estructura nativa se pierde en pocas horas a 20°C. Además, el análisis por ultracentrifugación de las muestras dializadas a 4°C durante 24 h, para eliminar la colina utilizada en la elución de la columna de DEAE-celulosa, mostraba dos formas mayoritarias con coeficientes de sedimentación de 2,89 S (compatible con el monómero) y 4,37 S (superior al dímero) en ausencia de colina, y al menos cuatro formas de asociación diferentes con coeficientes de sedimentación 4,3 S, 7,2 S, 10,3 S y 14,7 S en presencia de colina a 300 mM, lo que estaría indicando agregación de la muestra (véase **Figura 8.3** del Anexo). Debido a ello, cualquier cambio en actividad derivado de la sustitución del residuo Glu109 por alanina no puede atribuirse de forma inequívoca al papel de dicho residuo en la catálisis y pone de manifiesto la importancia del Glu109 para la estabilidad de Skl.

Tabla 4.1.6. Masas moleculares promedio relativas ($M_{w,app}/M_0$) de Skl silvestre y los mutantes C31A y H92A en ausencia y en presencia de colina 300 mM medidas por equilibrio de sedimentación ^a

Proteína	$M_{w,app}/M_0$	
	tampón PB	300 mM colina
Skl wt	1,06	1,77
C31A	1,06	2,19
H92A	1,28	2,29

^aMedidas realizadas a 20°C en tampón PB, pH 6,5 (21 µM proteína).

4.1.3.b. Modelado del módulo de unión a colina. Superficie de dimerización

La predicción de estructura secundaria del CBM de C-Skl indicaba la presencia de hebras- β en las posiciones esperadas a partir de las estructuras conocidas de otras CBPs (**Figura 4.1.13**). Se observó, no obstante, una cierta tendencia a incluir en la primera hebra de cada repetición algunos residuos del giro con que finaliza la repetición anterior. La búsqueda de patrones estructurales realizada con DELTA-BLAST identificó como mejor molde posible a la estructura cristalográfica completa del CBM de LytA (C-LytA) de un profago de *S. pneumoniae* (código PDB: 4IWT) con un 63,12% de identidad y un 100% de cobertura (residuos 144 a 288) (Mellroth *et al.*, 2014). Como muestra el alineamiento de la **Figura 4.1.13**, la mayoría de las diferencias en secuencia se encuentran en algunos lazos que unen las horquillas beta.

A partir de dicho alineamiento se generaron 20 modelos con MODELLER, y aquellos con menor energía relativa según el potencial DOPE se evaluaron energéticamente (VERIFY3D) y estereoquímicamente (Procheck).

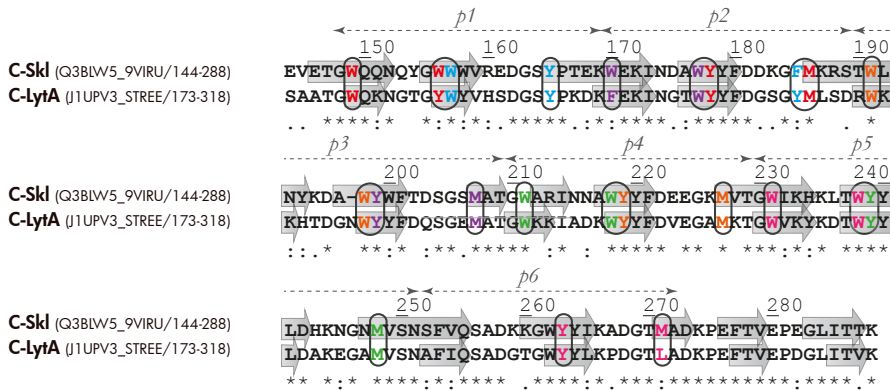


Figura 4.1.13. Alineamiento de secuencias y elementos de estructura secundaria de los CBMs de Skl (C-Skl) y LytA (C-LytA). Las flechas gruesas grises indican la posición de las hebras- β en el molde (C-LytA) y en la predicción realizada para C-Skl (numeración según la secuencia de Skl). Las flechas discontinuas $p1$ a $p6$ señalan las secuencias de las repeticiones. Los residuos implicados en la unión de colina, conservados en ambas proteínas, están enmarcados en negro. Los colores indican los aminoácidos implicados en la unión de cada una de las moléculas de colina (*sitio 1* en azul, *2* en rojo, *3* en morado, *4* en naranja, *5* en verde, *6* en magenta). El *sitio 1* es el no canónico. Los símbolos indican identidad (*), sustituciones conservativas (:) y semi-conservativas (·).

RESULTADOS

En las **Figura 4.1.15 A** y **4.1.14** se muestran, respectivamente, la estructura del mejor modelo generado y las representaciones de Ramachandran y VERIFY3D.

El modelo de C-Skl muestra una estructura compuesta de 7 horquillas- β , que a su vez forman una superhélice a izquierdas, análoga a la de C-LytA, en la que los residuos implicados en la unión a colina aparecen secuencial y estructuralmente conservados (**Figuras 4.1.13** y **4.1.15 B**).

El mapa de Ramachandran (**Figura 4.1.14 A**) calculado con Procheck muestra un único residuo en la zona no permitida (Gln153), que en el molde corresponde a la Gly182. Los demás residuos de C-Skl que aparecen señalados en rojo en el mapa (Asp162, Ser164 y Lys235) están conservados en la secuencia en C-LytA, y se encuentran en los bucles que

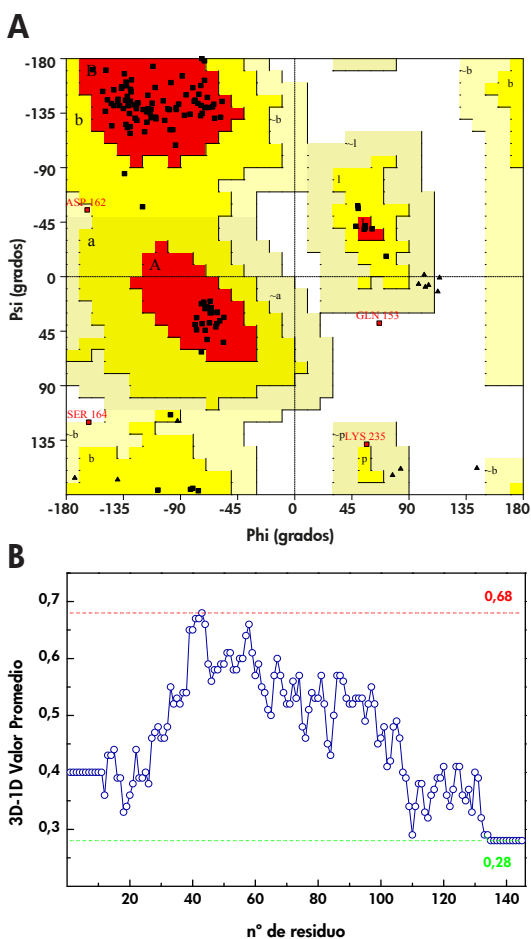


Figura 4.1.14. Evaluación estereoquímica y energética del modelo 3D de C-Skl.

(A) Representación de Ramachandran. Los residuos de glicina se representan como triángulos y el resto de los residuos como cuadrados. En rojo, regiones más favorables (87,5%); amarillo, regiones permitidas (9,4%); crema, regiones generosamente permitidas (2,3%); blanco, regiones prohibidas (0,8%). Los residuos que aparecen en rojo en el mapa se encuentran en lazos de la estructura, tanto en el modelo como en el molde. (B) Valor promedio de la energía por residuo, calculado con VERIFY-3D, que se muestra en azul. Los trazos rojo y verde representan el valor máximo (0,68) y mínimo (0,28) obtenidos.

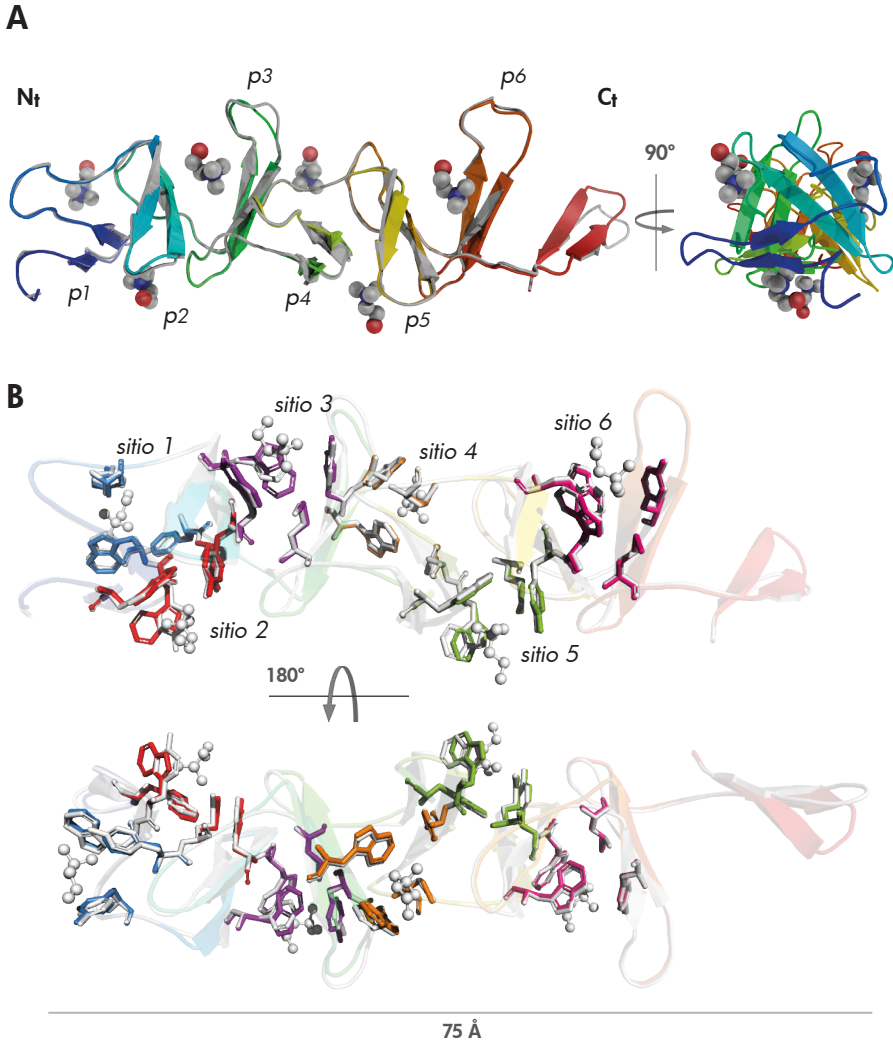


Figura 4.1.15. Modelo 3D de C-Skl. (A) Vista lateral de la superposición del modelo de C-Skl generado con MODELLER (coloreado por repeticiones; *p1* a *p6*) con la estructura del molde (C-LytA, en gris), y vista basal mostrando la estructura de la superhélice a izquierdas. Las moléculas de colina se representan con modelo de esferas (C: gris, N: azul, O: rojo). (B) Superposición de las cadenas laterales de los residuos de C-Skl potencialmente implicados en la unión de colina, representadas con el código de colores utilizado en la **Figura 4.1.13** (modelo de bastones) con los residuos correspondientes de C-LytA, representados en blanco. Las moléculas de colina (modelo de bastones y esferas) se transfirieron desde la estructura cristalina de C-LytA (PDB: 4IWT), excepto en el *sitio 2*, para el que se transfirió desde CbpF (PDB: 2X8O), al no haber colina unida al sitio correspondiente de C-LytA debido al empaquetamiento cristalino.

conectan las horquillas- β . La Lys265 de LytA, equivalente a la Lys235 de Skl, también se encuentra en esa zona del mapa. VERIFY-3D (**Figura 4.1.14 B**) evalúa la compatibilidad de la estructura con su propia secuencia de aminoácidos. El trazo rojo representa el máximo valor promedio obtenido (0,68) que, aunque algo menor, es comparable al de C-LytA (0,78).

4.1.3.b1. Reconocimiento de colina

Los sitios canónicos de unión a colina están situados en la interfaz de dos repeticiones consecutivas (p_n y p_{n+1}). La interacción es, por un lado, de naturaleza hidrofóbica con los tres grupos metilos de la colina, y en ella participa un residuo hidrofóbico (metionina o leucina) localizado en el bucle que une la repetición p_{n+1} a la p_{n+2} , y por otro lado, de tipo catión- π entre los anillos ricos en electrones de los aminoácidos aromáticos y la carga positiva de la colina (Fernández-Tórner *et al.*, 2001). A diferencia de LytA o las endolisinas Pal, Ejl y Cpl-1, el tipo de residuos que conforman los sitios canónicos de unión a colina están perfectamente conservados en cada una de las repeticiones de Skl: dos triptófanos de la repetición p_n , una tirosina de la repetición p_{n+1} y un residuo de metionina en el bucle que une ésta última a la repetición siguiente (**Tabla 4.1.7**). En LytA existe además un sitio de unión no canónico formado por el Trp186 de la segunda hebra- β de la repetición $p1$ y dos residuos aromáticos (Tyr194 y Tyr214) situados en los bucles de las repeticiones $p1$ y $p2$, respectivamente (**Figuras 4.1.13 y 4.1.15**). Los tres residuos están conservados también en las secuencias de Skl (*sitio 1*), Ejl, Pal y Cpl-1, que podrían unir, como LytA, una molécula adicional de colina. La transferencia de las moléculas de colina de la estructura de C-LytA a los *sitios 1 y 3 a 6* de Skl no indica la existencia de impedimentos estéricos que dificulten la entrada del ligando. Lo mismo ocurre con el primer sitio canónico (*sitio 2*), en el que la molécula de colina del posible complejo ha sido transferida por superposición con la estructura cristalográfica de CbpF (código PDB: 2X8O).

Si bien los elementos conservados de secuencia serían en principio suficientes para la unión de colina, la ausencia de estructuras a alta resolución de la proteína no nos permite establecer si todos ellos serían funcionales, ni tampoco descartar la presencia de variaciones en el plegamiento global del CBM que, como en Cpl-1 (Hermoso *et al.*, 2003) modificasen la capacidad de unión a colina.

Tabla 4.1.7. Residuos de Skl potencialmente implicados en la formación de los sitios de unión a colina.

Sitio	Residuos				Repeticiones implicadas
1^a	W157	Y165	F185	—	p1-p2
2	W149	W156	Y178	M186	p1-p2
3	W170	W177	Y199	M207	p2-p3
4	W191	W198	Y219	M227	p3-p4
5	W211	W218	Y239	M248	p4-p5
6	W231	W238	Y263	M271	p5-p6

^a Sitio no canónico identificado en C-LytA (Li *et al.*, 2015; Mellroth *et al.*, 2014), propuesto también a partir de la estructura de Cpl-1 (Buey *et al.*, 2007).

4.1.3.b2. Interfaz de dimerización

La formación del dímero de C-LytA implica la creación de interacciones mayoritariamente hidrofóbicas entre las horquillas C-terminales del CBD y el alineamiento de las horquillas beta de la repetición *p6* de ambos monómeros (**Figura 4.1.16**). El análisis de la estructura permite distinguir tres regiones hidrofóbicas (véase **Tabla 4.1.8**) cuyas interacciones hacen posible la asociación de los monómeros característica de C-LytA, señalándose como especialmente importantes la Tyr294 y la Ile315 (Fernández-Tornero *et al.*, 2002). En concreto, la isoleucina-315 se considera un residuo clave en la dimerización inducida por colina y su mutación reduce la actividad específica de LytA sobre paredes de neumococo en un 90 %, independientemente de la carga o polaridad del aminoácido por el que se sustituya (Romero *et al.*, 2007). La formación de seis enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el Trp292 y la Ile315 (dobles) por un lado, y el Asp312 y la Tyr293 por otro, contribuye también a la estabilización del dímero (Fernández-Tornero *et al.*, 2002).

En la **Figura 4.1.16 A** se muestra la superposición del modelo generado para el dímero de C-Skl con el dímero de C-LytA. Todos los aminoácidos de las dos últimas horquillas-β de C-LytA implicados en los contactos hidrofóbicos importantes para la dimerización están conservados en la secuencia de C-Skl (**Tabla 4.1.8**), y posiblemente también en la estructura (**Figura 4.1.16 B**), a excepción de la Val317, que en Skl correspondería

Tabla 4.1.8. Conservación en Skl de los residuos implicados en la dimerización de LytA.
Se han subrayado los residuos especialmente importantes para la dimerización, y los no conservados se resaltan en negrita. Las zonas hidrofóbicas implicadas en la dimerización de LytA se señalan en Fernández-Tornero *et al.*, 2002.

	Zona I			Zona II					Zona III		
Skl	F253	W262	Y264	P275	F277	V279	I285	T287	S256	Y263	L284
LytA	F283	W292	<u>Y294</u>	P305	F307	V309	<u>I315</u>	V317	S286	Y293	L314

a la Thr287. En LytA, la Val317 interacciona con la Phe283 y la Tyr294 dentro del monómero, para formar el núcleo hidrofóbico implicado en la dimerización. La sustitución de un grupo metilo por un hidroxilo asociada al reemplazo de valina por treonina podría afectar en Skl a los contactos del núcleo hidrofóbico con la Phe253 y la Tyr264, desestabilizando la formación del dímero (**Figura 4.1.16 B**). De hecho, el mutante V317T de LytA es un monómero en ausencia de colina, al igual que Skl silvestre, y la concentración de colina necesaria para la dimerización es un orden de magnitud mayor ($\cong 20$ mM) (Romero *et al.*, 2007), mientras que la actividad se reduce al 50 % con respecto a LytA. Las dos últimas horquillas- β del CBD y el lazo que las une difieren, también, en otros 8 aminoácidos, que estarían localizados fuera de la interfaz del dímero según el modelo construido para Skl. Además, la mayoría de las diferencias existentes son, en principio, poco significativas desde el punto de vista químico. Hay que señalar, sin embargo, el cambio de la Ala267 de Skl, situada en el bucle entre las dos últimas horquillas, por la Pro297 en LytA, y la presencia de dos lisinas (Lys259 y Lys260) en lugar de la Gly289 y la Thr290 de LytA (véase **Figura 5.8** en la Discusión). Estos dos últimos residuos se encuentran orientados hacia el exterior en el giro de la penúltima horquilla- β y podrían influir en la orientación relativa de las dos últimas horquillas, afectando a la facilidad para formar el dímero, explicándose así las elevadas concentraciones de colina (~ 300 mM) necesarias para la completa dimerización de Skl. Por otro lado, esta drástica disminución de la afinidad parece sugerir que el *sitio 6*, situado entre las repeticiones *p5* y *p6*, podría estar implicado en la dimerización, tal y como se ha propuesto también en LytA (Maestro & Sanz, 2005).

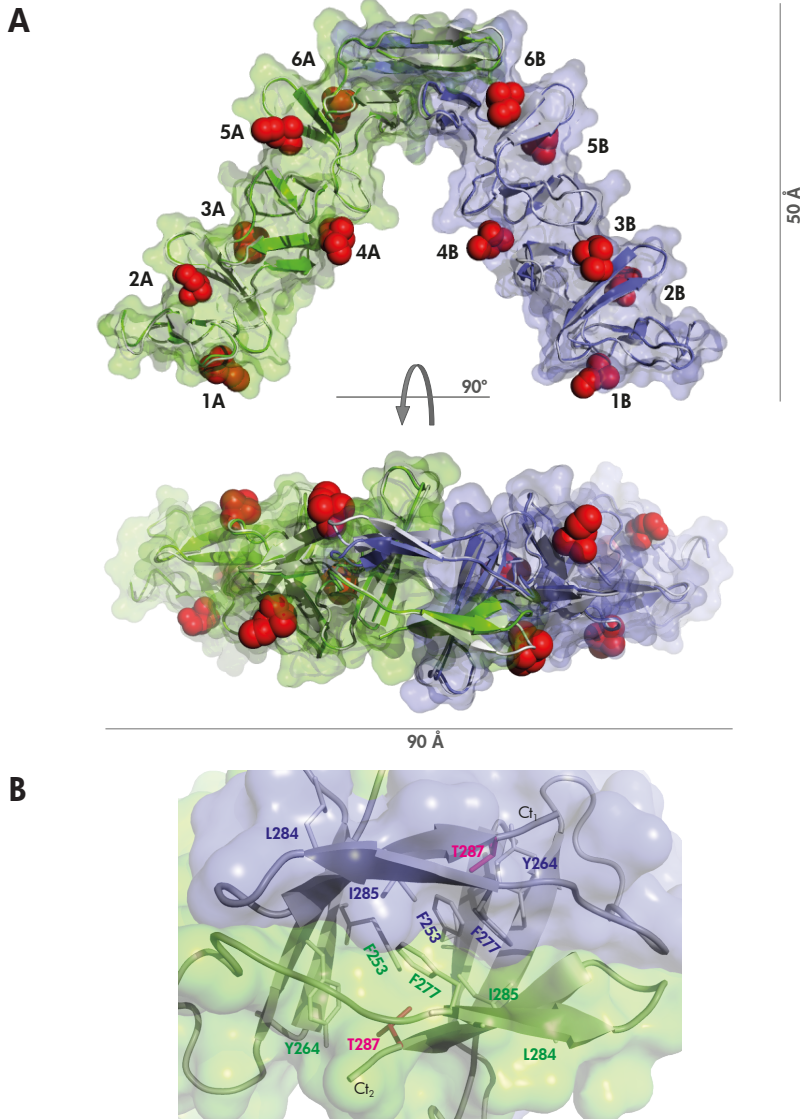


Figura 4.1.16. Modelo del dímero de C-Skl e interfaz de dimerización.

(A) Superposición con PyMol de dos monómeros del modelo de C-Skl (en verde y en azul) generado con MODELLER con la estructura del dímero de C-LytA (en blanco) (PDB: 4IWT). Los residuos de colina se representan con esferas rojas numeradas en cada monómero (1-6A y 1-6B). (B) Interfaz de dimerización de C-Skl basada en la estructura del dímero de C-LytA. Se señalan algunos de los aminoácidos implicados en la formación del núcleo hidrofóbico (modelo de bastones), que están conservados en secuencia y posición a excepción de la Thr287 (Val317 en LytA) (en magenta). Ct₁ y Ct₂ marcan los extremos C-terminales de cada monómero.

4.1.4. Caracterización de la organización modular de Skl por SAXS

La organización en dominios de Skl y los cambios estructurales inducidos en solución por la unión de colina se estudiaron también por SAXS. Los perfiles de dispersión se registraron a 4°C utilizando radiación sincrotrón y unas condiciones experimentales que favorecían la formación del monómero o del dímero. La caracterización del monómero se realizó en Tris 50 mM, pH 8,0, mientras que la del dímero unido a colina se llevó a cabo en el mismo tampón suplementado con 300 mM colina. Cada muestra se midió a tres concentraciones diferentes para descartar la contribución de efectos debidos a la asociación y/o la interferencia entre partículas.

La **Figura 4.1.17** muestra los perfiles experimentales obtenidos en ausencia y en presencia de colina a las tres concentraciones de Skl utilizadas tras sustraer la contribución del tampón, así como el valor de los radios de giro (R_g) obtenidos mediante la representación de Guinier con AutoRg a dichas concentraciones. En presencia de colina las diferencias en los R_g están dentro del error experimental, por lo que se puede asumir que no hay interferencias por efecto de atracciones ni repulsiones entre las moléculas. Sin embargo, en los experimentos en ausencia de colina el valor de R_g disminuye al aumentar la concentración de Skl, un efecto que podría derivarse de la hidratación de las partículas (Kim & Gabel, 2015) o de interferencias entre las mismas (Putnam *et al.*, 2007). Para eliminar este efecto los análisis estructurales se realizaron con los perfiles de dispersión obtenidos tras extrapolar a dilución infinita las curvas experimentales (concentración cero). Como puede verse en la **Figura 4.1.17**, la forma de los perfiles es diferente en ausencia y en presencia de colina, pero no varía al cambiar la concentración de proteína.

En la **Figura 4.1.18 A** se muestra la representación de Kratky, cuya forma acampanada y ausencia de “plateau” confirma que la proteína está correctamente plegada en las condiciones de medida. La distribución de pares de distancias en ausencia de colina obtenida con GNOM (**Figura 4.1.18 B**), con un máximo a 23 Å y otro alrededor de 40 Å, es típica de proteínas multidominios. El hecho de que éstos se mantengan, acompañados de otro máximo adicional a $\cong 80$ Å, en la distribución correspondiente al dímero, sugiere que los dominios de Skl mantienen su entidad estructural en ambos estados de asociación.

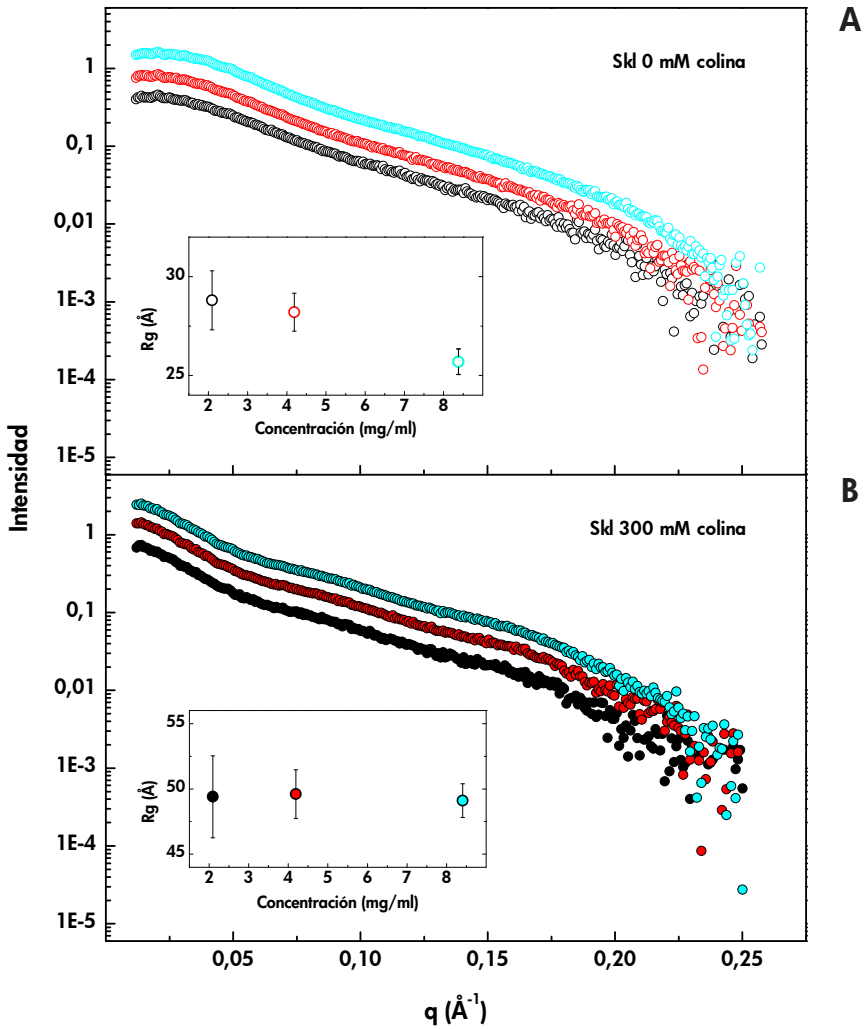


Figura 4.1.17. Perfiles experimentales de SAXS de Skl. Los espectros de dispersión se registraron en ausencia (**A**) y en presencia (**B**) de colina 300 mM, a tres concentraciones diferentes de Skl (en negro, 2,1 mg/ml; en rojo, 4,2 mg/ml; y en cian, 8,4 mg/ml). Los insertos muestran la dependencia de los valores de R_g obtenidos con AutoRg (representación de Guinier) con la concentración de Skl. Las medidas se realizaron a 4°C en Tris 50 mM, pH 8,0.

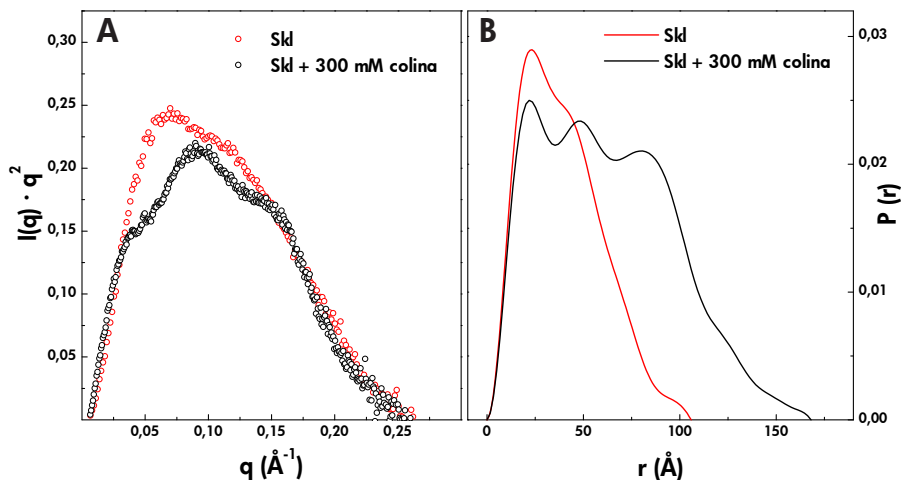


Figura 4.1.18. Representación de Kratky (A) y distribución de pares de distancias en el espacio real de la partícula en solución (B) en ausencia (en rojo) y en presencia (en negro) de 300 mM colina. Los datos se calcularon a partir de los perfiles de dispersión extrapolados a dilución infinita. Los diagramas de la distribución de pares de distancias se calcularon con GNOM.

En la **Tabla 4.1.9** se muestran los valores de los parámetros estructurales relacionados con el tamaño y la geometría de las partículas en solución, obtenidos mediante diferentes representaciones y análisis de los datos experimentales con el paquete de programas ATSAS. Aunque tanto los resultados obtenidos mediante aproximaciones automáticas (Auto R_g , AutoPorod y AutoGnom) como las estimaciones de R_g e I_0 (intensidad a $q=0$) derivados de la aproximación de Porod son orientativos, la concordancia entre ellos es indicativa de la calidad de las medidas. Por otro lado, los valores obtenidos con GNOM para el radio de giro (R_g) y la distancia máxima dentro de la partícula (D_{max}) indican claramente que la dimerización supone un incremento notable en la longitud de la partícula, lo que concuerda con los aumentos observados en el coeficiente de fricción traslacional y en el radio de Stokes obtenidos por velocidad de sedimentación. Asimismo, el incremento en D_{max} desde 105-106 nm hasta aproximadamente 170 nm tras la unión de colina indica: *i)* que la dimerización no tiene lugar mediante interacciones laterales entre monómeros; y *ii)* que el ángulo entre monómeros es inferior a 180° .

Tabla 4.1.9. Parámetros estructurales en solución de Skl obtenidos a partir de los perfiles de SAXS, mediante distintos tratamientos de datos.

	R_g (Å)	I_o	D_{max} (Å)	Volumen de Porod (Å ³)	M_w estimado (kDa)
Monómero					
Auto R_g	30,3 ± 0,1	1,5	—	—	—
Guinier	30,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	—	—	—
Autoporod	—	—	—	68	41
Porod	29,5	1,8	—	52	30
AutoGnom	31,3 ± 0,1	1,80 ± 0,03	105	—	—
Gnom manual	30,8 ± 0,5	1,82 ± 0,02	105	—	—
Dímero					
Auto R_g	49,8 ± 0,2	2,9	—	—	—
Guinier	49,8 ± 0,3	2,9 ± 0,1	—	—	—
Autoporod	—	—	—	109	65
Porod	39,8	2,4	—	71	51
AutoGnom	50,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	170	—	—
Gnom manual	50,3 ± 0,1	2,9 ± 0,1	168	—	—

Como primera aproximación al modelado de la estructura tridimensional de la molécula completa, se construyeron modelos de esferas para ambas formas de Skl utilizando métodos *ab initio* (DAMMIN, DAMMIF), sin y con restricción de simetría P2 en el caso de Skl con colina, donde tanto los datos de equilibrio de sedimentación como la masa molecular estimada por SAXS indican la formación de un dímero. Los modelos generados con ambos programas fueron similares. El modelo cuyo perfil de dispersión presentaba menor desviación (χ^2) respecto al experimental fue, en el caso del monómero, el de menor NSD de 10 modelos obtenidos con DAMMIN en modo “slow” y, en el caso del dímero, el modelo

promedio de 9 modelos preliminares (se descartó uno divergente) con restricción de simetría P2 obtenidos con DAMMIF (**Figura 4.1.19**).

De acuerdo con los mejores modelos generados, el monómero de Skl tendría dos regiones bien diferenciadas que podrían corresponder a N-Skl y a C-Skl, considerando la forma y las dimensiones de los modelos obtenidos para ambos y las estructuras cristalográficas y en solución (SAXS) de otras CBPs (Buey *et al.*, 2007; Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2003, 2005; Mellroth *et al.*, 2014).

Por otro lado, la forma en V del cuerpo central del dímero es similar a la estructura cristalográfica de C-LytA en presencia de colina (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2015; Mellroth *et al.*, 2014), lo que apoya de nuevo el modelo a alta resolución del dímero de C-Skl generado por superposición con el dímero de C-LytA. Los parámetros hidrodinámicos y estructurales calculados con el programa HYDRO++ para los modelos de esferas obtenidos con DAMMIN/DAMMIF se muestran en la **Tabla 4.1.10** y son comparables a los obtenidos directamente a partir de los datos de SAXS (GNOM) y del orden de los determinados por velocidad de sedimentación, lo que apoya su compatibilidad con el comportamiento hidrodinámico de ambas formas de Skl.

Uno de los aspectos más interesantes de SAXS es la posibilidad de utilizar los perfiles de dispersión para caracterizar la organización modular de proteínas o la disposición de distintos componentes en complejos macromoleculares, particularmente si se dispone de las estructuras o de modelos a resolución atómica de los elementos que los forman. La disposición relativa de N-Skl y C-Skl en el monómero y el dímero se exploró moviendo y rotando los modelos de la estructura 3D como cuerpos rígidos hasta alcanzar el mejor ajuste del espectro de SAXS utilizandolos programas SASREF y BUNCH (Petoukhov & Svergun, 2005) (**Figura 4.1.20**). En el caso del dímero se utilizaron como cuerpos rígidos el modelo de C-Skl construido en el **apartado 4.1.3.b2** y los módulos catalíticos (**apartado 4.1.3.a**). Los modelos cuyos espectros teóricos de dispersión mostraban menor desviación (χ^2) con respecto a los experimentales se obtuvieron con SASREF. Tanto los modelos propuestos para N-Skl y C-Skl como la orientación relativa de los mismos en los modelos generados con SASREF son compatibles con la envuelta molecular de los modelos de esferas obtenidos *ab initio* (**Figura 4.1.20**), como evidencia su encaje dentro de la envuelta molecular de los mismos realizado con

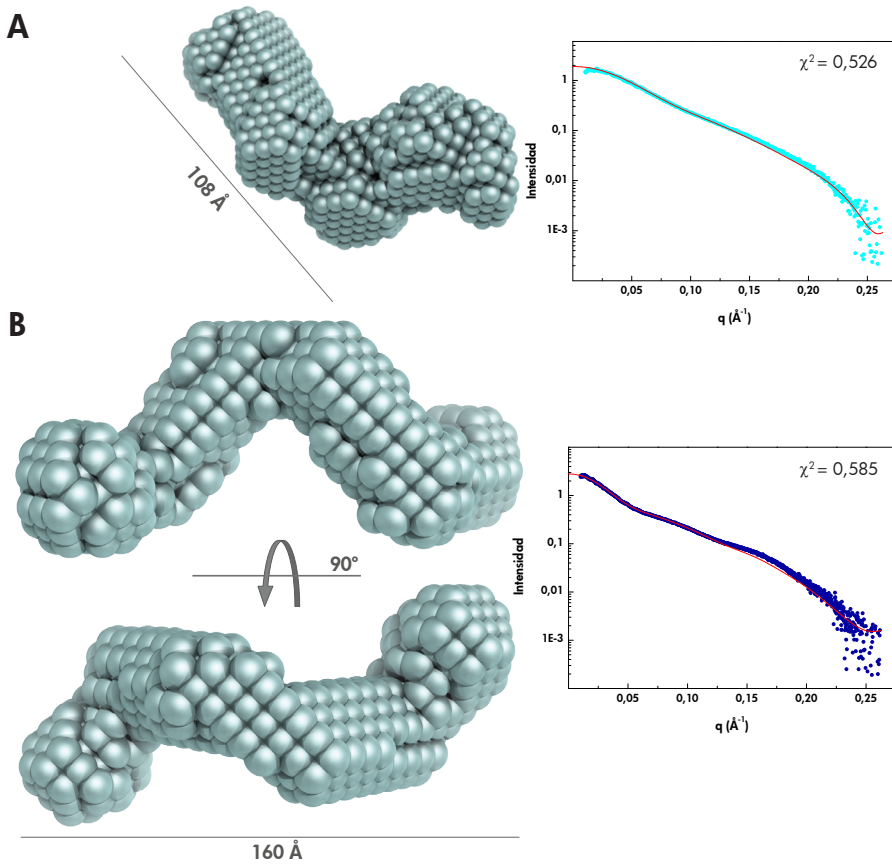


Figura 4.1.19. Modelos de esferas generados para el monómero (A) y el dímero (B) de Skl. Generados con DAMMIF a partir de los datos de SAXS con restricción de simetría P2 en el caso del dímero. A la derecha de los modelos se muestra el ajuste de sus respectivos perfiles teóricos (líneas rojas) a los perfiles experimentales (círculos cian (monómero) y azules (dímero)); χ^2 indica la desviación de los datos experimentales con respecto a los perfiles teóricos.

el programa SUPCOMB (Kozin & Svergun, 2001). La desviación del espectro teórico del monómero con respecto al experimental es algo mayor que para el modelo de esferas, especialmente a los valores de q más altos (distancias más cortas). Como puede verse en la **Tabla 4.1.10**, los valores teóricos de $s_{20,w}$, R_g y $D_{máx}$ calculados con HYDROPRO para los modelos del monómero y el dímero generados con SASREF son del orden de los experimentales.

Tabla 4.1.10. Parámetros hidrodinámicos obtenidos por diferentes métodos para el monómero y el dímero de Skl.^a

	Monómero				Dímero			
	$s_{20,w}$ (S)	R_g (Å)	R_s (Å)	$D_{máx}$ (Å)	$s_{20,w}$ (S)	R_g (Å)	R_s (Å)	$D_{máx}$ (Å)
UA	2,93	—	28,5	—	3,74	—	44,0	—
SAXS	—	30,8	—	105	—	50,3	—	168
Modelo esferas	2,53	31,0	32,2	—	3,72	49,1	43,8	—
SASREF	2,84	26,9	28,9	95	3,56	49,4	46,2	172

^a Datos calculados mediante ultracentrifugación analítica (UA); análisis de los espectros de SAXS con GNOM (SAXS); análisis de los modelos de esferas con HYDRO++; análisis de los modelos generados por SASREF con HYDROPRO (v7).

Asimismo, la superposición del modelo de SASREF (basado en el modelo del dímero de C-Skl generado por superposición con el dímero de C-LytA) con la envolvente del dímero es consistente con la propuesta de que la dimerización de Skl estaría mediada, como en C-LytA, por el extremo C-terminal de la cadena, aunque según el modelo de SAXS, el ángulo entre ambos módulos parece ser mayor que el adoptado en C-LytA. Es interesante el hecho de que a pesar de tener módulos catalíticos y especificidades de enlace distintas, la forma y el tamaño del dímero de Skl sean parecidos a los obtenidos para el dímero en solución de la lisozima Cpl-1 (Buey *et al.*, 2007), y de la amidasa LytA (Mellroth *et al.*, 2014). Los dominios catalíticos estarían, al igual que en LytA (Mellroth *et al.*, 2014) en posición *trans* respecto al plano formado por los CBMs.

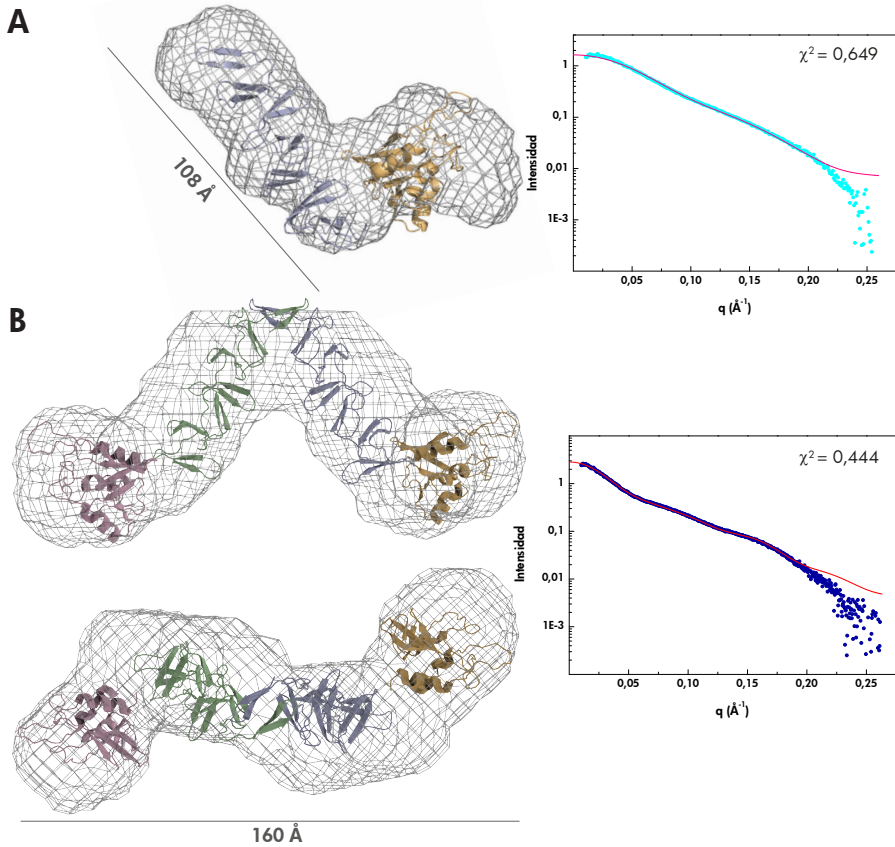


Figura 4.1.20. Disposición de N-Skl y C-Skl en la estructura de Skl (A) y en el complejo Skl/colina (B). Orientación de los módulos obtenida con SASREF para el monómero (A) y para el dímero formado en presencia de colina (B) y superposición de los modelos respectivos con las correspondientes envueltas moleculares de los modelos de esferas de la **Figura 4.1.19** (representación de rejilla). Los diagramas de cintas de N-Skl (módulo catalítico) se muestran en rosa y naranja, y los de C-Skl en verde y azul. A la derecha de la figura se comparan los espectros teóricos de los modelos generados con SASREF (líneas magenta) con los perfiles experimentales: círculos en cian (monómero) o azul (dímero). χ^2 indica la desviación de los datos experimentales con respecto a los perfiles teóricos calculados con CRY SOL.

4.1.5. Actividad lítica de Skl

Como se indicó en el **apartado 1.7** de la Introducción, las endolisinas de origen fágico constituyen una prometedora alternativa en la búsqueda de antimicrobianos que permitan combatir de forma específica la infección de patógenos multiresistentes a los antibióticos y que sean poco proclives al desarrollo de resistencias. Aunque la capacidad de Skl para degradar *in vitro* paredes celulares de *S. pneumoniae* y *S. mitis* ha sido demostrada (Llull *et al.*, 2006), no hay datos sobre su actividad bacteriolítica exógena contra patógenos Gram-positivos.

Por este motivo, y ante la falta de correlación entre la actividad bacteriolítica de ciertas lisinas y su actividad lítica sobre paredes aisladas (Díez-Martínez *et al.*, 2013, 2015; Blázquez *et al.*, 2016), se estudió la actividad antibacteriana de Skl sobre distintas cepas de *S. pneumoniae* y *S. mitis*. Los ensayos se llevaron a cabo según el protocolo descrito en el **apartado 3.2.6.b** de Materiales y Métodos, midiendo la variación con el tiempo de la DO_{550} de suspensiones de bacterias incubadas en PBS_{DTT} a 37°C en ausencia (control) y en presencia de la enzima, así como el número de bacterias viables (CFU/ml) tras 60 min de incubación. Como control positivo del ensayo se utilizó LytA, cuya actividad antibacteriana está suficientemente establecida (Díez-Martínez *et al.*, 2013; Jado *et al.*, 2003), y se verificó asimismo la actividad de ambas enzimas sobre paredes aisladas.

En la **Figura 4.1.21 A y B** se muestran los resultados obtenidos al exponer las cepas R6 (no capsulada) y D39 (capsulada; serotipo 2) de *S. pneumoniae* a dos concentraciones distintas (0,25 y 1 µg/ml) de enzima en PBS (pH 6,8) y sus respectivos controles. Como puede observarse en el caso de Skl, la caída de la DO_{550} y la tasa de supervivencia bacteriana son prácticamente iguales a las del control sin enzima para las dos cepas ensayadas. Por el contrario, la adición de LytA a las mismas concentraciones induce una drástica disminución en la DO_{550} en ambas cepas y una caída en el número de bacterias viables de alrededor de 1,5/2 unidades logarítmicas tras 60 minutos de exposición. En las condiciones experimentales utilizadas en estos ensayos las actividades específicas respectivas sobre paredes aisladas de neumococo eran $3,7 \times 10^5$ U/mg (LytA) y 4×10^3 U/mg (Skl).

Ante la falta de actividad bacteriolítica de Skl frente a *S. pneumoniae* se ensayó su actividad frente a la cepa lisogénica SK137 de *S. mitis*, portadora del fago ΦSK137 que codifica para Skl y cuyos ácidos teicoicos

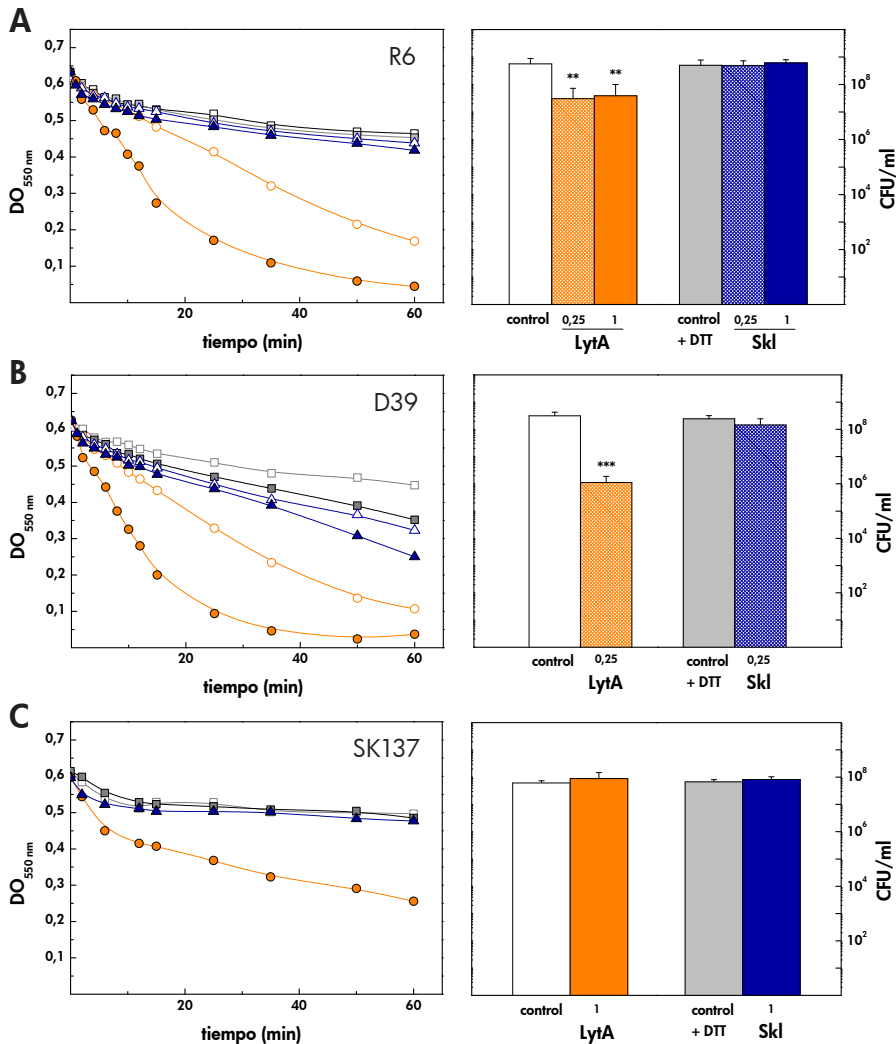


Figura 4.1.21. Actividad bacteriolítica y bactericida de Skl y LytA frente a las cepas (A) R6 y (B) D39 de *S. pneumoniae* y (C) la cepa SK137 de *S. mitis*.

Columna izquierda: Las bacterias se crecieron hasta alcanzar la fase exponencial, se centrifugaron, se resuspendieron en PBS (pH 6,8), hasta una $DO_{550} \cong 0,6$, y se incubaron a 37 °C en ausencia y en presencia de las enzimas, registrando la variación de DO_{550} con el tiempo. Control PBS (□), control PBS_{DTT} (■), Skl (△ y ▲; 0,25 y 1 µg/ml, respectivamente), LytA (○ y ●; 0,25 y 1 µg/ml, respectivamente). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. Columna derecha: el número de células viables (CFU/ml) a los 60 min de incubación (media de las medidas realizadas) se determinó sembrando la suspensión en placas de agar-sangre. Las barras de error indican las desviaciones estándar y los asteriscos indican los datos que son estadísticamente significativos comparados con su control (ANOVA de una vía y LSD de Fisher como test *post hoc*; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

RESULTADOS

también contienen colina (Bergström *et al.*, 2000) (**Figura 4.1.21 C**). Los datos muestran una moderada variación en la tasa de viabilidad tras exponerla a la acción de ambas enzimas (1 µg/ml) en las condiciones anteriormente utilizadas, y una moderada variación en la DO₅₅₀ en presencia de LytA.

Dado que la actividad de Skl sobre paredes es óptima a pH 6,5 y 30°C (Llull *et al.*, 2006) se realizaron ensayos ampliando el rango de condiciones experimentales con el objeto de explorar la influencia del pH, la temperatura y la concentración de proteína en la actividad bacteriolítica exógena de Skl. Como puede verse en la **Figura 4.1.22**, 37°C no se observó ningún cambio en el comportamiento de Skl frente a la cepa SK137 de *mitis* en los intervalos de pH y concentración ensayados. Sólo se detectó una caída significativa en la turbidez a concentración de 100-150 µg/ml en las medidas realizadas a pH 6,5 y 30°C (**Figura 4.1.23 B**).

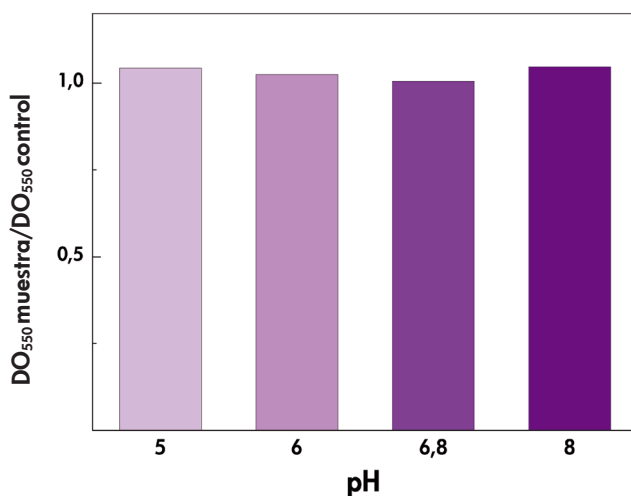


Figura 4.1.22. Efecto del pH sobre la actividad bacteriolítica de Skl sobre la cepa SK137 de *S. mitis*. Se representa la relación entre el valor de DO₅₅₀ de la muestra tratada a 37°C con 5 µg/ml de Skl (según se detalla en la **Figura 4.1.21**) y el del control no tratado a los 60 min de incubación.

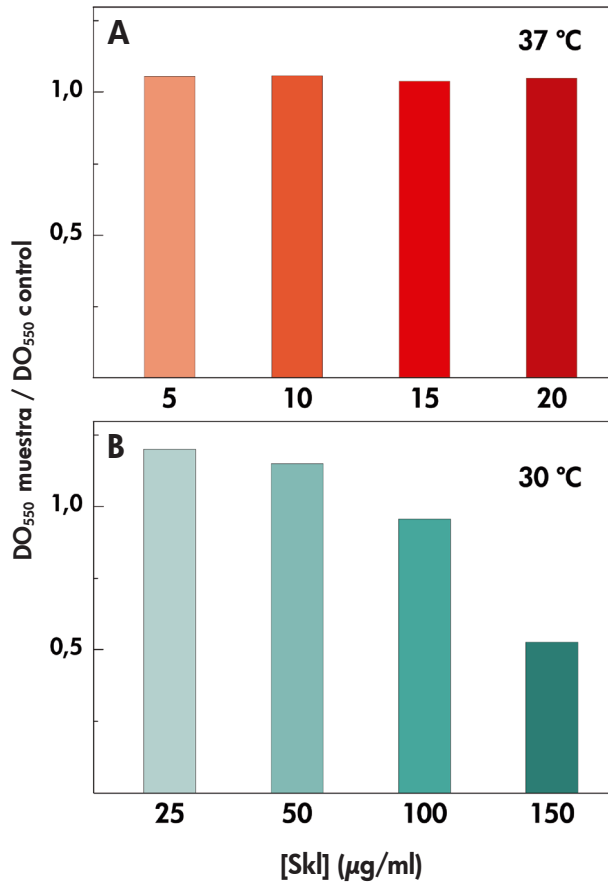


Figura 4.1.23. Influencia de la temperatura y la concentración de enzima en la actividad bacteriolítica de Skl frente a la cepa SK137 de *S. mitis*. Las bacterias, crecidas y resuspendidas en PBS (pH 6,5) según se detalla en la **Figura 4.1.21**, se incubaron en ausencia (control) y en presencia de Skl a las concentraciones y temperaturas indicadas en la figura. Los datos muestran la relación entre el valor de DO_{550} de la muestra tratada y el del control no tratado a los 60 min de incubación.

ENZIMAS QUIMÉRICAS

4.2

Como se indicó en la Introducción, la actividad y especificidad de las enzimas líticas procedentes de organismos Gram-positivos y sus fagos vienen determinadas en gran medida por:

- el tipo de receptor reconocido por los módulos de unión a la pared celular en la superficie de la bacteria y su afinidad hacia el mismo
- la actividad intrínseca del módulo catalítico
- la disposición de los distintos módulos en la estructura tridimensional de la enzima.

El acceso a la pared celular desde el exterior de bacteria es, por otro lado, un proceso complejo controlado por diversos factores, entre los que se encuentran el grado de entrecruzamiento del PG, la composición y distribución de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos y otras moléculas de superficie, y el polisacárido de la cápsula (Díez-Martínez *et al.*, 2013; Díez-Martínez *et al.*, 2015). Todos ellos modifican sustancialmente el aspecto de la envuelta externa de la bacteria, aportándole, al mismo tiempo, un continuo de carga negativa (Yother, 2011) que hace que la carga neta de las enzimas líticas y sus módulos desempeñe, también, un papel importante en la actividad bacteriolítica exógena (Díez-Martínez *et al.*, 2013; Low *et al.*, 2011).

RESULTADOS

Así, mureín hidrolasas con actividades específicas comparables sobre paredes purificadas pueden mostrar actividades bacteriolíticas muy distintas cuando actúan desde el exterior de la bacteria, y la modificación de la carga neta de los módulos puede alterar tanto el rango de sustratos susceptibles como la eficacia catalítica sobre una determinada especie o cepa (Low *et al.*, 2011; Díez-Martínez *et al.*, 2013).

Como se muestra en la **Tabla 4.2.1**, la carga neta total de Skl y LytA es prácticamente idéntica, estando compensado el ligero aumento de carga negativa que presentan el módulo catalítico y el “linker” ($\cong -2$ unidades) de Skl por una disminución prácticamente similar en el CBM, el cual muestra, además, diferencias en la distribución de carga a lo largo de su secuencia.

Tabla 4.2.1. Comparación de la carga neta a pH 7,0 de Skl y LytA. ^a

Carga neta	Total	CM	linker	CBM	p1	p2	p3	p4	p5	p6	C-tail
Skl	-14,68	-9,01	-2,99	-2,69	-1,99	1,01	-1,00	-1,00	2,27	0,00	-2,00
LytA	-14,57	-8,03	-1,85	-4,69	-0,86	-1,00	0,14	1,01	0,00	-2,00	-2,00

^a Calculada con Sednterp a partir de la secuencia. CM, módulo catalítico; C-tail, segmento C-terminal.

Esta observación, unida al hecho de que Skl y LytA parecen adoptar formas similares en solución, sugiere que la gran diferencia de actividad de Skl y LytA frente a paredes de neumococo o suspensiones de bacterias podría reflejar en gran medida la menor afinidad del CBM de Skl por colina, y/o la elevada concentración de ligando que ésta requiere para formar dímeros (la pérdida de la capacidad de dimerización en LytA conlleva una caída de actividad del 90 %; Varea *et al.*, 2000). Como se mostró en el **apartado 4.1.3.b**, las secuencias de aminoácidos de C-LytA y C-Skl muestran un alto porcentaje de similitud (63,83 % identidad y 87,94 % similitud con LytA de la cepa R6 de *S. pneumoniae*; 63,12 % y 85,81 % con el molde utilizado para el CBM), y los residuos responsables de la unión de colina y la dimerización están total o mayoritariamente conservados, respectivamente (**Figuras 4.1.13, 4.1.14 B y Tabla 4.1.8**). No puede descartarse, por otro lado, la existencia de diferencias en la actividad intrínseca de sus respectivos módulos catalíticos, que

carecen de homología y utilizan mecanismos catalíticos distintos para hidrolizar el mismo tipo de enlace, ni la posible influencia de la distribución local de cargas en la molécula.

4.2.1. Construcción de enzimas líticas quiméricas entre las amidasas LytA y Skl

Con el objetivo de investigar el papel de las diferencias de secuencia de los CBMs sobre la actividad bacteriolítica y bactericida, y también con el propósito de obtener nuevas lisinas con mayor actividad bactericida, se procedió a la construcción de enzimas quiméricas mediante recombinación *in vitro* de las regiones de los genes que codifican para los dominios catalíticos y de unión a colina de LytA y Skl, según el esquema de la **Figura 4.2.1**. En ambos casos, para alterar lo menos posible la interacción entre módulos y, por consiguiente, la organización modular específica de cada proteína, se mantuvo el conector (“linker”) asociado al módulo catalítico de cada enzima y parte de la primera repetición de su CBM (las secuencias completas se muestran en el **Anexo, Tablas 8.3 y 8.4**).

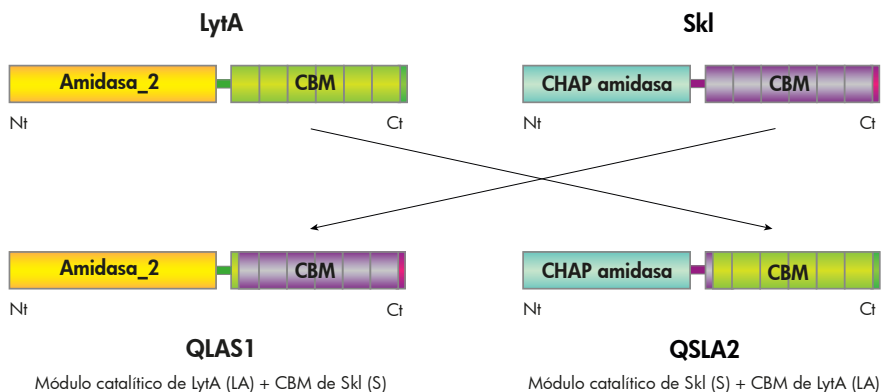


Figura 4.2.1. Esquema de construcción de las enzimas quiméricas entre las amidasas LytA y Skl. Intercambio de módulos realizado para obtener las enzimas quiméricas QLAS1 y QSLA2. En ambos casos se mantuvo el “linker” y parte de la primera repetición del CBM asociado al módulo catalítico de cada enzima parental. El procedimiento para su construcción se detalla en Materiales y Métodos (sección 3.2.4.a), y las secuencias completas en el Anexo (Tablas 8.3 y 8.4).

El procedimiento seguido para la construcción y purificación de estas quimeras se encuentra detallado en el **apartado 3.2.4.a** de Materiales y Métodos. Las quimeras se expresaron en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* y se purificaron con buen rendimiento (QLAS1 ~ 25 mg y QSLA2 ~ 500 mg por cada 2 litros de cultivo) siguiendo el procedimiento utilizado para las enzimas parentales, lo que permitió demostrar, además, que sus CBMs eran funcionales.

Tras el clonaje, expresión y purificación de las quimeras se procedió a su caracterización estructural y funcional en comparación con las enzimas parentales, para así establecer hasta qué punto contribuye cada dominio a la actividad lítica de las enzimas parentales, y la influencia de las posibles interacciones entre dominios tanto en la actividad como en sus características químico-físicas.

4.2.2. Caracterización estructural de las quimeras

Para comprobar el correcto plegamiento y estudiar la funcionalidad de las quimeras se compararon en primer lugar sus espectros de DC con los de Skl y LytA y se procedió a su titulación con colina, caracterizando igualmente la estructura cuaternaria y la estabilidad frente a la temperatura.

4.2.2.a. Caracterización espectroscópica de la estructura secundaria y terciaria, y de la interacción con colina

Los espectros de DC en la región del UV-lejano de las dos quimeras se asemejan a los de las proteínas parentales, observándose, además, una clara relación entre la forma del espectro en la región de 220 a 240 nm y el tipo de módulo catalítico, tanto en ausencia como en presencia de colina (**Figura 4.2.2**). El espectro de QLAS1 muestra un mínimo bastante intenso en torno a 210 nm cuya magnitud disminuye de forma significativa tras la unión de colina, sin que se vea alterada la posición del mismo. La adición de colina induce, además, la aparición de un pequeño máximo centrado a 225 nm (**Figura 4.2.2 A**). El espectro de QSLA2 muestra, además del mínimo a 210 nm, dos máximos a 232 y a 224 nm, presentes también en Skl, y solo este último se ve modificado en presencia de colina (**Figura 4.2.2 B**). La aparición del máximo a 225/224 nm o el aumento de la intensidad del ya existente tras la unión de colina es, por tanto, un rasgo común de los cuatro CBMs, mientras que la modificación o no

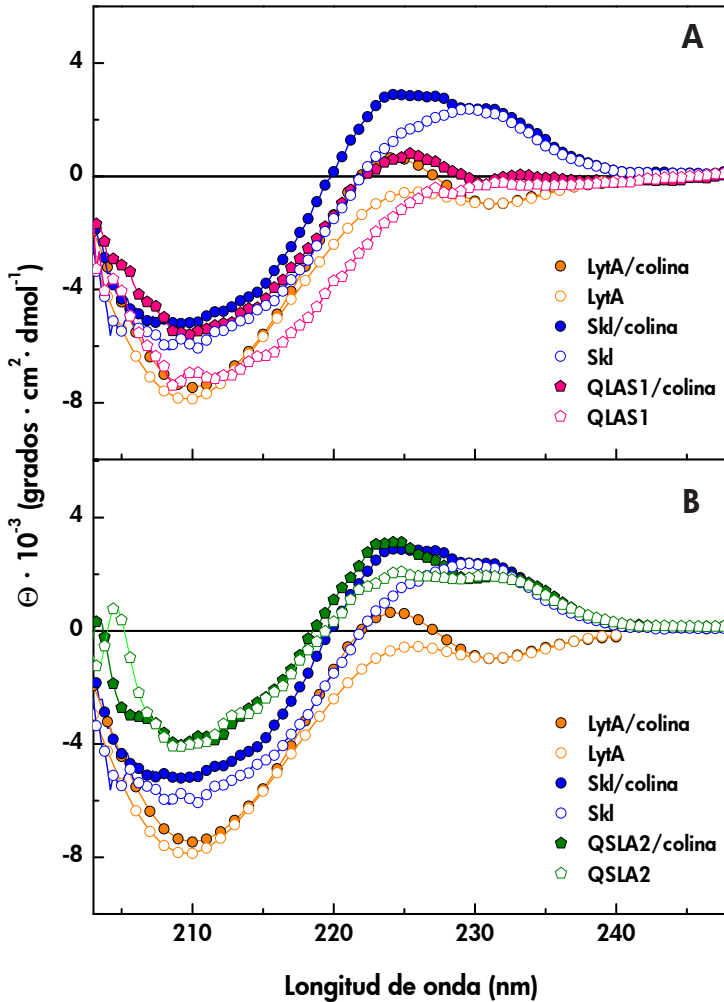


Figura 4.2.2. Comparación de los espectros de DC en el UV-lejano de LytA, Skl y las quimeras QLAS1 y QSLA2. (A) y (B) comparan los espectros de QLAS1 y QSLA2, respectivamente, con los de las enzimas parentales. Las medidas se realizaron a 20 °C en ausencia y en presencia de colina 100 mM a 15 μ M proteína (tampón PB, pH 7,5). Los datos de LytA se tomaron de Medrano *et al.*, 1996.

del mínimo a 210 nm viene determinada por el CBM que cada proteína contiene (apenas varía en LytA y QSLA2, y disminuye en Skl y QLAS1). Por el contrario, la presencia de bandas positivas a 230 nm es una característica específica del dominio CHAP, presente en Skl y QSLA2.

En la **Figura 4.2.3** se comparan las curvas de valoración de las quimeras con las de las enzimas parentales, obtenidas tras representar la variación de la elipticidad molar por residuo a 222-224 nm en función de la concentración de colina. De acuerdo con la hipótesis de partida, la sustitución del CBM de Skl por el de LytA aumenta significativamente la afinidad por colina de QSLA2 con respecto a Skl, mientras que la afinidad de QLAS1, portadora del CBM de Skl, disminuye con respecto a LytA, aproximándose a la de Skl. QSLA2, además, mantiene el carácter bifásico de la unión de colina observado tanto en LytA como en Skl. Las líneas continuas representan el ajuste teórico de los datos experimentales a un modelo de uno/dos clases de sitios de unión en términos de la ecuación de Hill (**apartado 3.2.5.d2** de Materiales y Métodos). En la **Tabla 4.2.2** se muestran las constantes aparentes de disociación y los valores del índice de Hill (n_H) estimados a partir del ajuste.

Tabla 4.2.2. Parámetros de unión de colina determinados a partir del ajuste de las curvas de valoración obtenidas por DC en términos de la ecuación de Hill.

Proteína	$K_{0,5 \text{ app}}^1 \text{ (mM}^{-1}\text{)}$	n_H^1	$K_{0,5 \text{ app}}^2 \text{ (mM}^{-1}\text{)}$	n_H^2
QLAS1	$22,9 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,2$	—	—
QSLA2	$0,2 \pm 0,1$	1-2	9 ± 2	$1,3 \pm 0,4$
LytA	$0,63 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,5$
Skl	$\sim 1\text{-}5$	1	96 ± 3	$3,0 \pm 0,3$

La afinidad aparente por colina del CBM de LytA obtenida a partir del ajuste es comparable a la que muestra en la quimera QSLA2 tras su fusión con el módulo catalítico de Skl, aunque la cooperatividad del proceso de unión a los sitios de menor afinidad es significativamente menor. Por el contrario, la fusión del CBM de Skl al módulo catalítico de LytA en la quimera QLAS1 modifica de forma notable la afinidad aparente

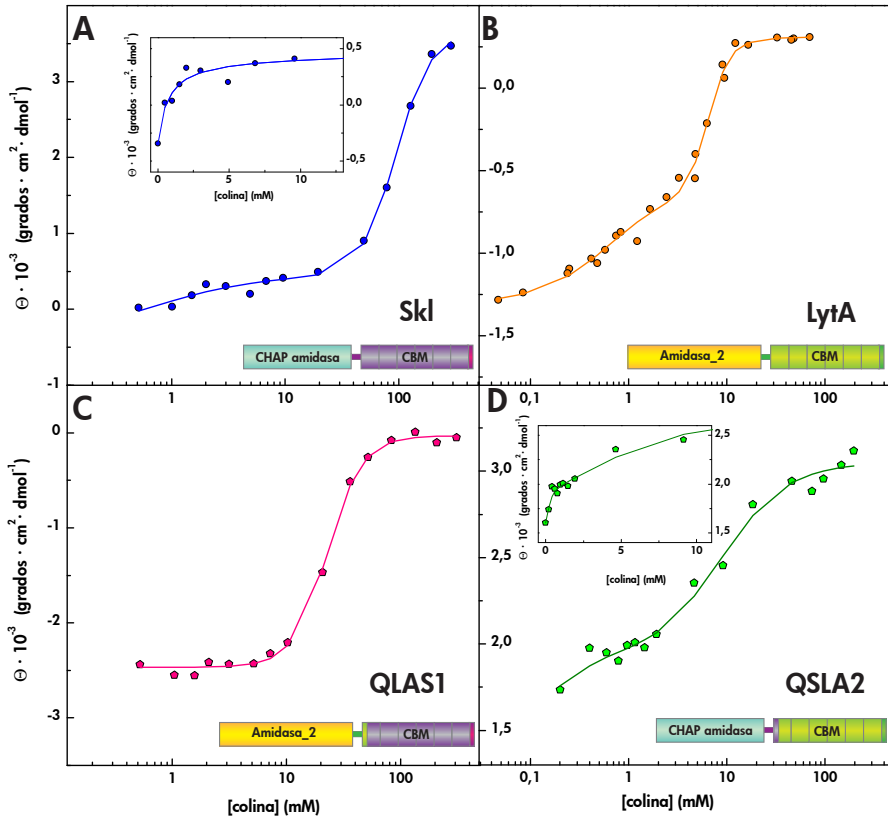


Figura 4.2.3. Valoración con colina de las quimeras QLAS1 y QSLA2; comparación con las enzimas parentales Skl y LytA. Dependencia de la elipticidad molar por residuo a 222 nm (224 nm en LytA) con el logaritmo de la concentración de colina. Los “insertos” en los paneles de Skl y QSLA2 muestran una ampliación de la primera fase de las curvas de valoración. Las valoraciones de Skl y las quimeras se realizaron a 20 °C en tampón PB 20 mM, pH 6,5, a una concentración de proteína entre 6 y 15 μM , y los datos de LytA se tomaron de Medrano *et al.*, 1996. Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos experimentales en términos de la ecuación de Hill, asumiendo una (QLSA1) o dos clases de sitios de unión (Skl, LytA y QSLA2).

por el aminoalcohol con respecto a la mostrada en Skl, de forma que la unión de colina puede describirse en términos de una sola clase de sitios de unión con una constante de disociación intermedia a las de los sitios de menor y mayor afinidad observados en Skl.

4.2.2.b. Estructura cuaternaria de QLAS1 y QSLA2. Influencia de la unión de colina

El estado de asociación de las quimeras y su posible variación tras la unión de colina se estudió por ultracentrifugación, realizando experimentos de equilibrio y velocidad de sedimentación.

En la **Tabla 4.2.3** se muestra la variación de la relación entre la masa molecular aparente y la masa del monómero ($M_{w\ app}/M_0$) en función de la concentración de colina, calculada a partir de los experimentos de equilibrio de sedimentación. En ausencia de colina QLAS1 sedimenta como una especie ideal única con una masa molecular aparente ligeramente superior a la del monómero ($M_0=36750$ Da; $M_{w\ app}/M_0 \cong 1,2$) lo que indica que puede haber una pequeña proporción de dímero o bien algo de agregación. El valor de $M_{w\ app}/M_0$ aumenta con la concentración de colina hasta alcanzar valores algo superiores a los esperados para un dímero ($M_{w\ app}/M_0 \cong 2,2$) a concentraciones de colina de 300 mM; un comportamiento similar al observado en SkI (véase **Figura 4.1.4**). En el caso de la quimera QSLA2, el valor de 1,4 obtenido para $M_{w\ app}/M_0$ en ausencia de colina sugiere que, al igual que en LytA (Usobiaga *et al.*, 1996), existe ya una población significativa de dímero en ausencia de este ligando. El hecho de que al añadir colina el valor de $M_{w\ app}/M_0$ supere al

Tabla 4.2.3. Dependencia de la masa molecular aparente relativa ($M_{w,app}/M_0$) de las quimeras QLAS1 y QSLA2 con la concentración de colina. Medidas de equilibrio de sedimentación realizadas a 20°C con 6 μ M (0,2 mg/ml) de proteína en tampón PB, pH 6,5.

[colina] (mM)	$M_{w\ app}/M_0$ QLAS1	$M_{w\ app}/M_0$ QSLA2
0	1,2	1,4
0,1	—	1,5
1	—	1,95
5	—	2,3
10	1,3	2,4
20	—	2,4
100	—	2,3
300	2,2	—

esperado para un dímero podría indicar la formación de dímeros y la presencia de un cierto porcentaje de especies con mayor masa molecular.

Para establecer las poblaciones presentes se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación. En ausencia de colina, y al igual que Skl, QLAS1 sedimenta dando lugar a un pico mayoritario correspondiente al monómero ($s_{20,w}=2,9$ S), observándose también una pequeña población de especies con mayor masa molecular (**Figura 4.2.4**). A medida que se añade colina, pasa a sedimentar como un dímero ($s_{20,w}=4,1$ S; $M_{w\text{ app}}$ estimada $\cong 70$ kDa), observándose de nuevo una pequeña fracción de especies cuyo coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}=6,5$ S) podría ser compatible con un tetrámero ($M_{w\text{ app}}$ estimada $\cong 140$ kDa). Por el contrario, el perfil de sedimentación de QSLA2 en ausencia de colina presenta dos picos cuyos coeficientes de sedimentación ($s_{20,w}=2,7$ S y $s_{20,w}=3,8$ S) son compatibles con las masas del monómero y el dímero, respectivamente, y similares a los obtenidos para las correspondientes especies de Skl.

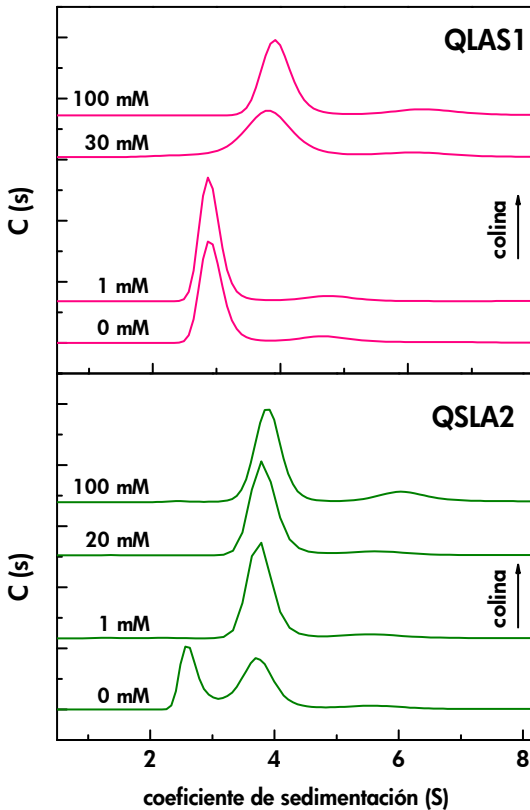


Figura 4.2.4. Distribución de coeficientes de sedimentación de las quimeras QLAS1 y QSLA2 en ausencia y en presencia de colina.

Medidas realizadas a 20°C en tampón PB, pH 6,5, 6 μ M (0,2 mg/ml) de proteína.

A 20 mM colina el 95 % de la proteína sedimenta como un dímero cuyo coeficiente de sedimentación ($s_{20,w} = 4,0$ S) es ligeramente inferior al del dímero de LytA ($s_{20,w} = 4,2$ S) (Usobiaga *et al.*, 1996). Como en Skl y QLAS1, aparecen también picos minoritarios a valores de s superiores a 4 S que corresponderían a un pequeño porcentaje de tetrámero y explicarían los valores de $M_{w,app}/M_0$ obtenidos por equilibrio de sedimentación.

El intervalo de concentraciones de colina en el que tiene lugar la dimerización de QLAS1 coincide con el de saturación de los sitios en la valoración realizada por DC (ver **Figura 4.2.3**), mientras que en QSLA2, al igual que en LytA, la dimerización está asociada a la saturación de los sitios de mayor afinidad.

4.2.2.c. Estabilidad térmica y organización modular de las quimeras. Influencia de la unión de colina

La caracterización estructural de las quimeras se completó estudiando su estabilidad térmica en ausencia y en presencia de colina, con el objetivo de verificar la preservación de la estabilidad estructural mostrada por los dominios en las enzimas parentales y la organización modular característica de las mismas.

4.2.2.c1. Análisis espectroscópico: DC

El proceso de desnaturalización se siguió registrando la variación de la elipticidad inducida por el aumento de la temperatura a 222 nm. Los experimentos se llevaron a cabo en tampón PB a un pH de 7,5, puesto que a pH = 6,5 se producía la precipitación de la quimera QLAS1, dificultando la comparación con las otras enzimas estudiadas.

Como se puede observar en la **Figura 4.2.5**, los perfiles de desnaturalización de las quimeras muestran los rasgos característicos de los módulos que contienen, siendo la relación más evidente en los complejos con colina, al disminuir el solapamiento entre las transiciones del dominio catalítico y el CBM. Todos ellos muestran la abrupta caída en la elipticidad característica de la desnaturalización de los CBMs en esta región del espectro, vista también en Skl, con la diferencia de estabilidad que caracteriza a C-Skl y C-LytA. La baja o nula contribución de la desnaturalización del módulo de tipo CHAP a los cambios de elipticidad registrados en la región de 222-224 nm, hace que tanto Skl como QSLA2, portadoras del mismo, presenten una única sigmoide en ausencia y en presencia de colina a esa longitud de onda (**Figura 4.2.5 B y D**). En LytA y QLAS1, por el contrario, la desnaturalización del módulo catalítico de

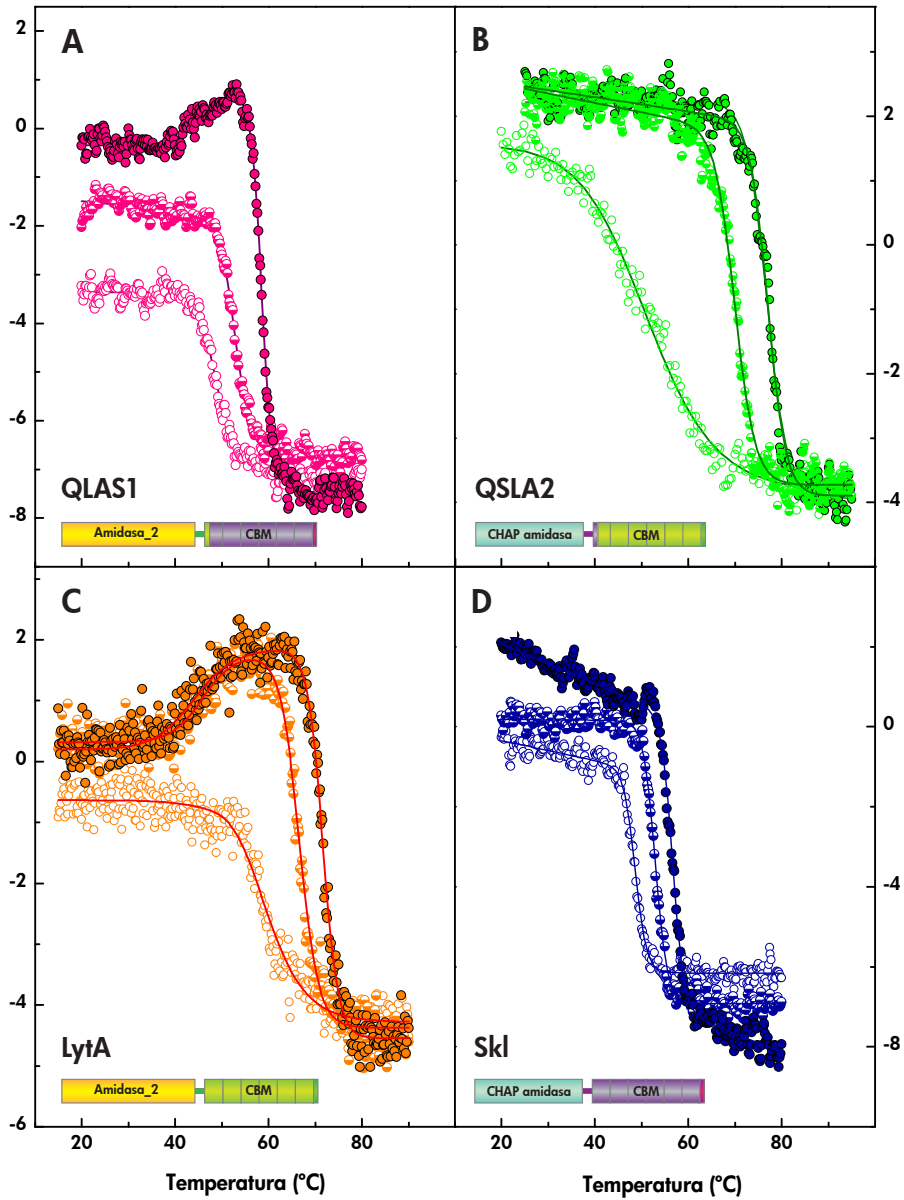


Figura 4.2.5. Dependencia de la estabilidad térmica de QLAS1, QSLA2 y las enzimas parentales con la concentración de colina. Variación de la elipticidad molar con la temperatura a 224 nm (LytA) o 222 nm (Skl, QLAS1 y QSLA2) en ausencia (círculos abiertos) y en presencia de colina 20 mM (círculos semi abiertos) y 100 mM (círculos cerrados). Las medidas se realizaron en tampón PB, pH 7,5 con una velocidad de calentamiento de 40 °C/h (8-12 μ M de proteína).

tipo Amidasa_2 da lugar un aumento de la elipticidad que se hace visible en presencia de colina, al desplazarse la desnaturalización de los respectivos CBMs hacia temperaturas más altas (**Figura 4.2.5 A y C**). La diferencia de estabilidad de C-LytA y C-Skl y su diferente afinidad por colina hacen que en QLAS1 la transición debida al módulo catalítico solo sea visible a la concentración más alta de colina ensayada. En la **Tabla 4.2.4** se muestran los valores de $T_{1/2}$ obtenidos del ajuste de los perfiles de desnaturalización representados en la **Figura 4.2.5** a una o dos sigmoides.

Tabla 4.2.4. Comparación de los valores de $T_{1/2}$ de QLAS1, QSLA2 y las enzimas parentales obtenidos a 222 nm en ausencia y en presencia de colina.

[colina] (mM)	$T_{1/2}$ (°C)			
	Skl	QLAS1	QSLA2	LytA
0	48,7 ± 0,1	48,6 ± 0,2	51,3 ± 0,3	59,2 ± 0,2
20	52,89 ± 0,08	52,6 ± 0,1	69,99 ± 0,09	45,9 ± 0,6 66,56 ± 0,09
100	— 56,62 ± 0,08	46 ± 1 58,52 ± 0,06	— 77,09 ± 0,09	44,1 ± 0,5 71,59 ± 0,06

4.2.2.c2. Calorimetría diferencial de barrido

En la **Figura 4.2.6** se muestran los perfiles de desnaturalización obtenidos por DSC en condiciones comparables a las utilizadas en los experimentos de DC (40°C/h; tampón PB, pH 7,5; 9-12 µM de proteína). El primer rasgo a destacar es la similitud de la posición del máximo principal del termograma en las proteínas que comparten el mismo CBM y el efecto comparable que tiene la unión de colina en la estabilidad de los mismos. Así, a 100 mM colina (**Figura 4.2.6 B**) la temperatura de transición del CBM es de aproximadamente 75,7°C para QSLA2 y LytA, y de 56°C para Skl y QLAS1 a 40°C. La estabilización del CBM como consecuencia de la unión de colina permite visualizar, además, la similitud que muestran los termogramas de QLAS1 y LytA en la región correspondiente a la desnaturalización del módulo catalítico (Amidasa_2) que ambas comparten. Asimismo, la estabilización del CBM de QSLA2 hace visible la transición correspondiente al módulo catalítico (CHAP),

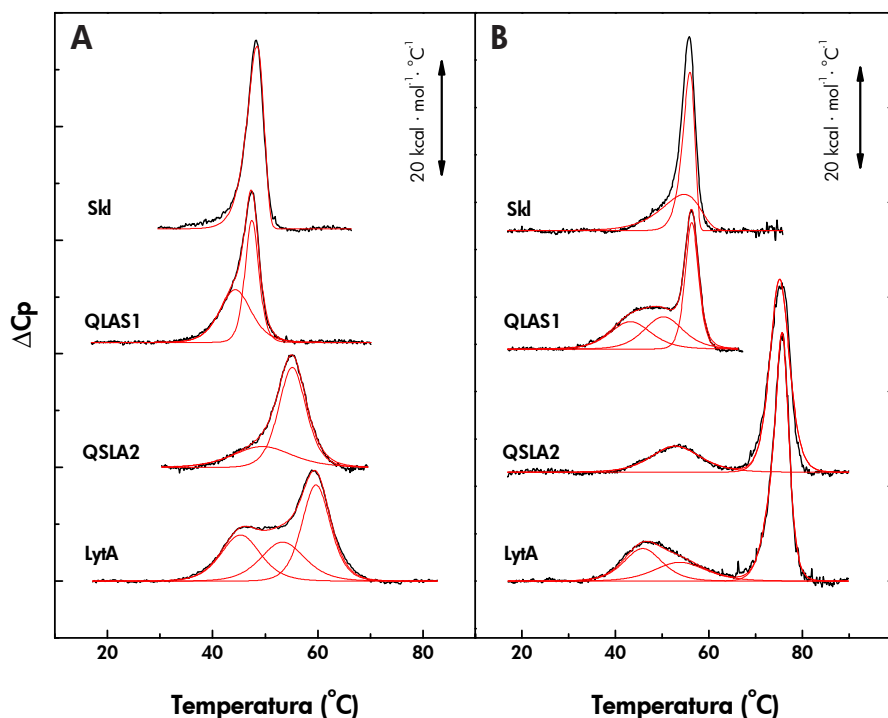


Figura 4.2.6. Comparación de las transiciones calorimétricas correspondientes a la desnaturalización térmica de QSLA1 y QSLA2 con las de las enzimas parentales en ausencia (A) y en presencia de colina 100 mM (B). En negro se muestran los perfiles experimentales y en rojo las transiciones obtenidas por deconvolución de los termogramas obtenidos a una velocidad de $40^\circ\text{C}/\text{h}$. Las medidas se realizaron en tampón PB, pH 7,5, a $9\text{--}12 \mu\text{M}$ de proteína.

cuyos valores de T_m ($53,7^\circ\text{C}$) y ΔH son parecidos a los estimados para la primera de las dos transiciones en que tiene lugar la desnaturalización del complejo Skl-colina (**Tabla 4.2.5**).

La desnaturalización de N-LytA, N-Skl y C-Skl, es irreversible, mientras que la de C-LytA es parcialmente reversible, observándose un comportamiento similar en las quimeras. Las curvas de capacidad calorífica muestran, de hecho, cierta dependencia de los termogramas de QSLA2 y QLAS1 con la velocidad de barrido, que evidencia la influencia de la/s etapa/s irreversible/s en la forma de los mismos e impide un tratamiento riguroso de los datos en términos de las ecuaciones derivadas para procesos en el equilibrio. A pesar de ello, y con el objetivo de visualizar de forma aproximada las transiciones existentes bajo las distintas envolventes,

se procedió a su deconvolución en la suma de transiciones elementales en el equilibrio. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.2.6** (curvas en rojo), junto al análisis de las curvas de Skl realizado en el **apartado 4.1.2.b**, y la deconvolución de los perfiles de LytA, cuya pequeña variación con la velocidad de barrido indica una escasa influencia de la etapa irreversible en los mismos. El modelo utilizado en cada caso y los parámetros del mejor ajuste se resumen en la **Tabla 4.2.5**.

Los resultados del análisis ponen de relieve el parecido del proceso de desnaturalización de los complejos QLAS1/colina y LytA/colina, con las diferencias esperables en la estabilidad de sus respectivos CBMs, y apoyan, asimismo, la existencia de dos transiciones bajo la envoltura de la forma libre de QSLA2. La similitud de los parámetros de la primera transición de esta quimera con los obtenidos para la asignada al módulo catalítico en el complejo Skl/colina y la baja influencia de la unión de colina sobre la misma apoyan su atribución a la desnaturalización del dominio CHAP, compartido por ambas proteínas. Es interesante desatacar, asimismo, cómo la unión de colina da lugar a la aparición de una tercera transición en el proceso de desnaturalización de QLAS1, cuya presencia en el perfil de LytA permite atribuirle a la desnaturalización del módulo catalítico o a la interfaz de éste con el “linker” inter-dominios y/o la región N-terminal del CBM.

Los cambios en el perfil de desnaturalización de QSLA2 registrado a 222 nm en ausencia de colina comienzan muy por debajo del intervalo de temperatura en que tiene lugar la desnaturalización del CBM, aunque la variación de la elipticidad inducida por la desnaturalización es comparable a los cambios observados en presencia de 100 mM colina, donde existe una buena correlación entre el intervalo de la transición en DC y la desnaturalización del CBM en DSC. Esta observación podría indicar la existencia de una pretransición en el CBM de QSLA2 que desaparecería tras la unión del ligando. Un comportamiento parecido ha sido descrito para algunos mutantes truncados en el CBM de LytA (Varea *et al.*, 2000).

El conjunto de los datos aportados por los estudios realizados muestra la capacidad de los módulos contenidos en Skl y LytA para adoptar en las quimeras una estructura comparable a la existente en las enzimas parentales, y conferirles el comportamiento esperable de los elementos estructurales que las forman. No pueden descartarse, no obstante, diferencias a nivel de la interfaz módulo catalítico/“linker”/CBM si los

Tabla 4.2.5. Comparación de los parámetros calorimétricos de la desnaturalización térmica de QLAS1 y QSLA2 con Skl y LytA en ausencia y en presencia de colina 100 mM.

Proteína	colina	ΔH_{total}	Tm_1	ΔH_1 (ΔH_{vH1})	Tm_2	ΔH_2 (ΔH_{vH2})	Tm_3	ΔH_3 (ΔH_{vH3})
	(mM)	(kcal/mol)	(°C)	(kcal/mol)	(°C)	(kcal/ mol)	(°C)	(kcal/ mol)
Skl	0	161 ^a	—				48,27 ^a	161 ^{ITS}
	100	190 ^a	54,7	84 ^{ITS}			55,94	113 ^{ITS}
QLAS1	0	155 ^a	44,35	74 (100) ^{NTS}			47,48	75 (234) ^{NTS}
		142 ^b	44,72	69 (106) ^{NTS}			47,85	71 (222) ^{NTS}
		180 ^c	44,92	97 (80) ^{NTS}			48,12	80 (193) ^{NTS}
	100	234 ^a	43,30	68 ^{TS}	50,36	75 ^{TS}	56,35	101 (227) ^{NTS}
		234 ^b	44,02	70 ^{TS}	51,98	69 ^{TS}	57,44	103 (244) ^{NTS}
		217 ^c	45,10	70 ^{TS}	52,70	65 ^{TS}	57,72	94 (241) ^{NTS}
QSLA2	0	182 ^a	49,48	60 ^{TS}			55,23	124 ^{TS}
		190 ^c	51,17	60 ^{TS}			55,75	126 ^{TS}
	100	296 ^a	53,74	71 ^d			75,60	226 (174) ^{NTS}
		286 ^b	54,27	68 ^d			75,87	219 (175) ^{NTS}
		273 ^c	55,13	65 ^d			76,07	208 (189) ^{NTS}
LytA	0	260 ^a	45,50	79 ^{TS}	50,36	69 ^{TS}	59,72	118 ^{TS}
		281 ^b	45,39	81 ^{TS}	51,98	76 ^{TS}	59,70	122 ^{TS}
		296 ^c	46,04	85 ^{TS}	52,70	77 ^{TS}	60,00	122 ^{TS}
	100	375 ^a	45,95	75 ^{TS}	53,96	58 ^{TS}	75,79	238 (214) ^{NTS}

Barridos realizados a 40 (a), 60 (b) y 80°C/h (c) en tampón PB, pH 7,5. (d) Entalpía obtenida por integración del área de la transición. Los superíndices TS, NTS e ITS indican ajustes a transiciones reversibles entre dos estados, reversibles no dos estados, e irreversibles entre dos estados, respectivamente. El valor de la entalpía de van'Hoff (ΔH_{vH}) para el modelo NTS se indica entre paréntesis; para el modelo TS, $\Delta H = \Delta H_{vH}$.

contactos establecidos en las formas naturales se extienden más allá de la posición 187 en QLAS1 o la 158 en QSLA2. Hay que destacar sin embargo, las diferencias observadas en las curvas de valoración por colina entre enzimas portadoras de CBMs idénticos salvo por los 11 aminoácidos conservados de la primera repetición de C-Skl en QSLA2 y de C-LytA en QLAS1.

4.2.3. Actividad lítica de las quimeras

4.2.3.a. Degradación de paredes celulares

Las actividades específicas de QLAS1 y QSLA2 frente a fragmentos de paredes de neumococo (Tabla 4.2.6) superan en un orden de magnitud a la de Skl, aunque son entre tres (QLAS1) y dos (QSLA2) veces menos eficaces que LytA tras la conversión. El aumento de la actividad específica de las quimeras con respecto a Skl podría ser debido al aumento de su afinidad global por colina con respecto a la enzima del fago, pero no explicaría el hecho de que la eficacia de ambas para degradar paredes de neumococo purificadas sea similar.

Tabla 4.2.6. Actividad lítica (U/mg de proteína) sobre paredes de neumococo marcadas con colina tritiada.

Proteína	Conversión	
	-	+
Skl	$(8 \pm 4) \times 10^3$	$(3 \pm 1) \times 10^4$
LytA	$(6 \pm 4) \times 10^5$	$(7 \pm 2) \times 10^5$
QLAS1	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^5$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^5$
QSLA2	$(3 \pm 1) \times 10^5$	$(3,8 \pm 0,5) \times 10^5$

Cada valor es la media de 3-5 medidas independientes realizadas a 37°C (30°C para Skl) en tampón PB, pH 6,8, suplementado con DTT 1 mM para Skl y QSLA2. En los ensayos con conversión las muestras se preincubaron 5 min a 0°C y a continuación 45 s a 43°C y 15 min a 37°C (Skl a 30°C) (véase apartado 3.2.6.a).

4.2.3.b. Ensayos sobre bacterias

La actividad antibacteriana de las proteínas quiméricas se ensayó, al igual que con Skl y LytA, frente a distintas cepas de *S. pneumoniae* y *S. mitis*, según el protocolo previamente descrito (PB pH 6,8, 37°C).

En la Figura 4.2.7 se muestran los resultados obtenidos con la cepa R6 de *S. pneumoniae*. La caída en la turbidez es prácticamente igual para el control sin enzima y para las muestras tratadas con Skl o la quimera QLAS1. Por el contrario, la adición de QSLA2 producía una caída en la turbidez superior al 90 % en menos de 30 min, y un descenso de la viabilidad (número de bacterias supervivientes) de 3 a 4,5 unidades logarítmicas, dependiendo de la concentración utilizada, en 60 min.

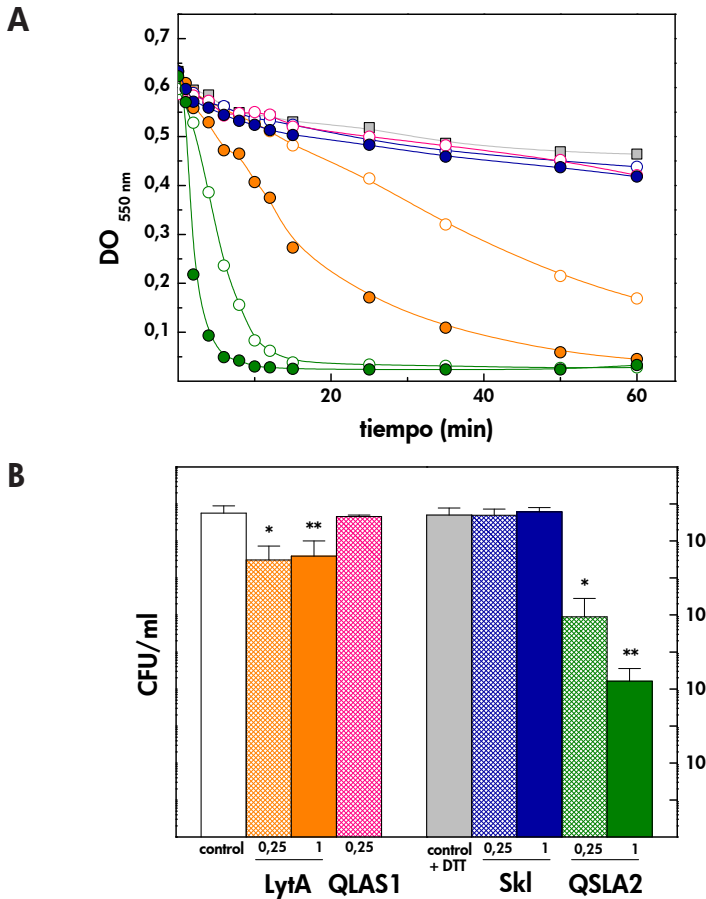


Figura 4.2.7. Comparación de la actividad antibacteriana de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a la cepa R6 de *S. pneumoniae*. Las bacterias se crecieron hasta alcanzar la fase exponencial, se centrifugaron y resuspendieron en PBS (pH 6,8) hasta una $DO_{550} \cong 0,6$, y se incubaron a 37 °C en ausencia y en presencia de las enzimas ensayadas (0,25 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de enzima). **(A)** La actividad bacteriolítica se siguió midiendo la caída de la DO_{550} durante 60 min. Los datos son representativos de al menos 3 medidas independientes. Control PBS y PBS_{DTT}: ■; LytA: ○ y ●; QLAS1: ◊ y ●; Skl: ○ y ●; QSLA2: ○ y ● (círculos abiertos y cerrados: 0,25 y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). **(B)** La actividad bactericida (ensayo de viabilidad) se evaluó a los 60 min de incubación con la enzima a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y/o a 1 $\mu\text{g/ml}$ (0,25 y 1 en la figura), determinando el número de células viables con respecto al control sin enzima. Los datos son la media de las medidas realizadas. Las barras de error indican las desviaciones estándar y los asteriscos indican los datos que son estadísticamente significativos comparados con el control (test U de Mann-Whitney, *: $p \leq 0,05$; ANOVA de una vía y LSD de Fisher como test *post hoc*; **: $p \leq 0,01$).

RESULTADOS

Ambos efectos son muy superiores a los observados a igual concentración de LytA, que disminuye la viabilidad alrededor de dos unidades logarítmicas (**Figura 4.2.7 B**). Según estos resultados, una única dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de QSLA2 es capaz de matar a más del 99,99 % de las bacterias en 60 min.

En la **Figura 4.2.8** se muestran datos de la actividad bacteriolítica de LytA y Skl ampliando el rango de concentración de enzima. En los dos casos, la caída de la DO_{550} es más rápida al aumentar la concentración, siendo la diferencia entre LytA y QSLA2 más evidente a partir de 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. No se aprecian grandes diferencias entre las concentraciones más altas de QSLA2 ensayadas. En el caso de LytA, la caída en la turbidez a la concentración máxima (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) no llega a igualar a la experimentada tras la adición de QSLA2 a la concentración más baja (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

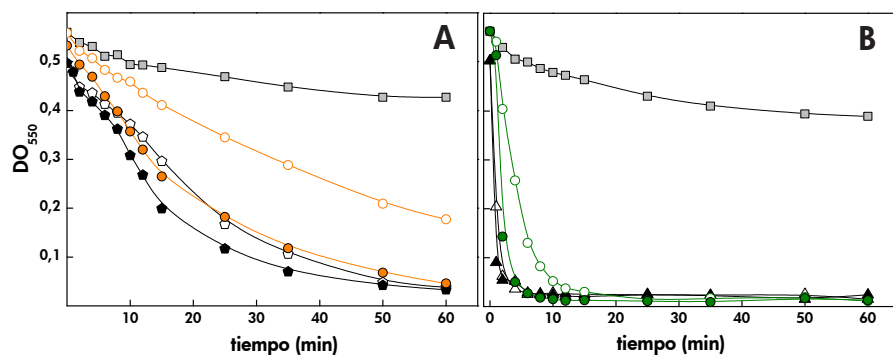
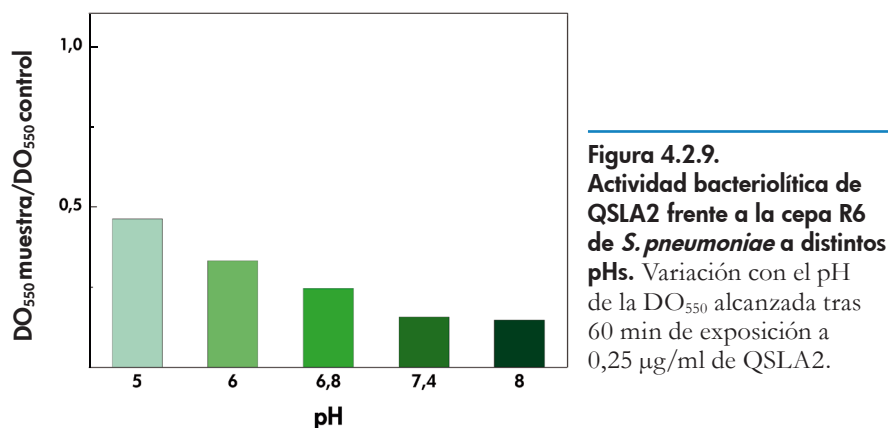


Figura 4.2.8. Efecto de la concentración de LytA y QSLA2 sobre la actividad frente a la cepa R6 de *S. pneumoniae*. (A) LytA: control PBS (■), 0,25 (○), 1 (●), 2,5 (△) y 10 (▲) $\mu\text{g}/\text{ml}$. (B) QSLA2: control PBS_{DTT} (■), 0,25 (○), 1 (●), 2,5 (△) y 10 (▲) $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las medidas se realizaron según el protocolo descrito en la **Figura 4.2.7 A**.

Explorando la variación en la actividad en función del pH (**Figura 4.2.9**) se observa que la actividad de la quimera QSLA2 mejora ligeramente a pHs básicos.



Tras los prometedores resultados con la cepa R6 (no capsulada) se quiso comprobar si la cápsula que presentan las cepas patógenas de *S. pneumoniae* constituía un impedimento a la lisis exógena de la pared bacteriana por QSLA2, y las posibles diferencias con respecto a las otras lisinas, por lo que se ensayaron sus letalidades sobre cepas con distintos serotipos y grosores de cápsula (D39, P007 y P008) (**Figura 4.2.10**).

Sobre la cepa D39, LytA es capaz de disminuir en dos unidades logarítmicas la supervivencia, mientras que QSLA2, además de actuar con más rapidez, la reduce más de tres unidades, a una concentración de tan sólo 0,25 µg/ml (**Figura 4.2.10 A y B**). Sobre la cepa P007, obtenida por transformación de la cepa M11 con DNA cromosómico de tipo capsular 3 (**Figura 4.2.10 C y D**), sólo QSLA2 es capaz de actuar, disminuyendo unas 2,5 unidades logarítmicas la supervivencia de las bacterias a 1 µg/ml. En la cepa P008, derivada de la cepa P007 con DNA de serotipo capsular 4, tanto LytA como Skl eran activas, aunque LytA no alcanza a reducir la viabilidad (menos de una unidad logarítmica) tanto como QSLA2 (alrededor de dos unidades) (**Figura 4.2.10 E y F**). La presencia y el tipo de cápsula influyen por tanto en la capacidad bacteriolítica y bactericida de LytA y QSLA2, aunque QSLA2 sigue siendo la más efectiva.

RESULTADOS

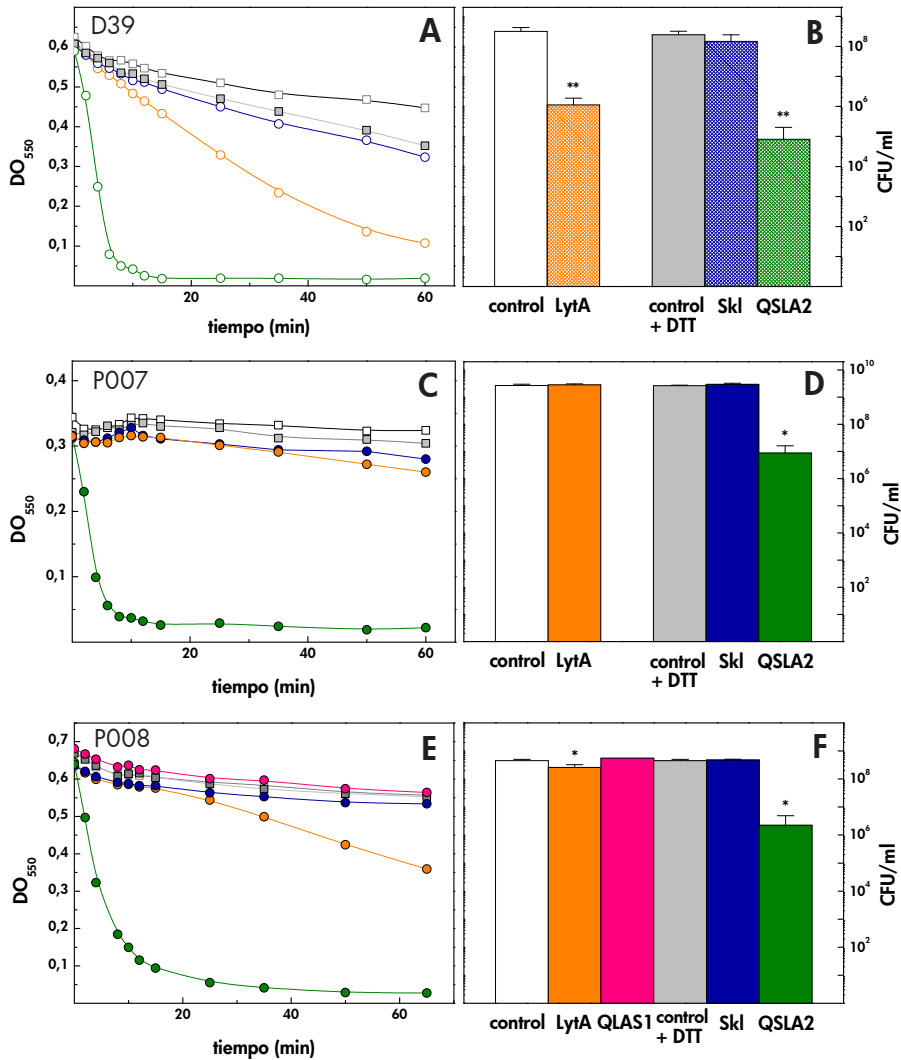


Figura 4.2.10. Efecto bacteriolítico/bactericida de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a distintas cepas capsuladas de *S. pneumoniae*. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo detallado en la Figura 4.2.7. (A) y (B): Ceba D39 (serotipo 2); (C) y (D): cepa P007 (serotipo 3); (E) y (F): cepa P008 (serotipo 4). Control PBS: □ y PBS_{DTT}: ■; círculos abiertos y cerrados: 0,25 y 1 µg/ml, respectivamente. LytA: ○ y ●; Skl: ○ y ●; QLAS1: ●; QSLA2: ○ y ●. Se han omitido algunos ensayos y/o resultados con la quimera QLAS1 tras comprobarse en experimentos preliminares que carecía de actividad bacteriolítica frente a las cepas ensayadas. Los datos son representativos de tres medidas independientes con tres réplicas cada una. (Ceba D39: ANOVA de una vía y LSD de Fisher como test *post hoc*; **: $p < 0,01$; Cepas P007 y P008: test U de Mann–Whitney, *: $p \leq 0,05$).

También se determinó la actividad bacteriolítica frente a las cepas multi-resistentes 48 (serotipo 23F) y 69 (serotipo 19F), resistentes a tetraciclina, amoxicilina, eritromicina y cloranfenicol, entre otros antibióticos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012) (**Figura 4.2.11**). La quimera QSLA2 es capaz de actuar sobre ambas cepas, mientras que ni QLAS1 ni ninguna de las dos enzimas parentales es capaz de eliminarlas en las condiciones empleadas. A igual concentración de enzima, la lisis de la cepa 48 (23F) en presencia de QSLA2 es más rápida que la de las otras cepas y disminuye la viabilidad en 4 unidades logarítmicas en 60 minutos, lo que equivale a matar el 99,99% de las bacterias.

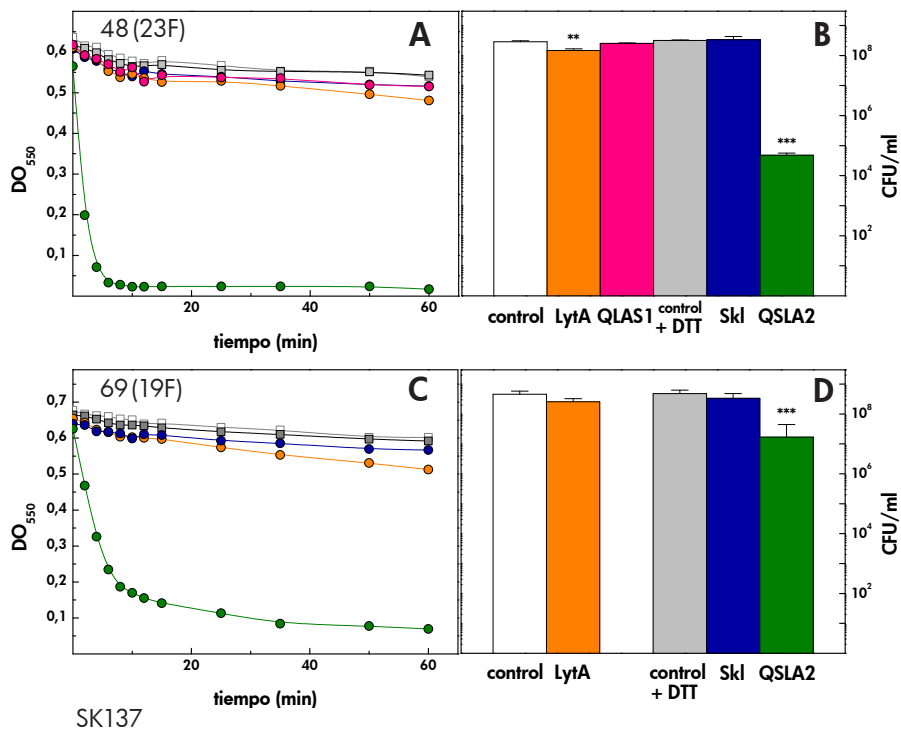


Figura 4.2.11. Efecto bacteriolítico/bactericida de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a distintas cepas multi-resistentes de *S. pneumoniae*. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo detallado en la Figura 4.2.7. (A) y (B): Cepa 48 (23F); (C) y (D): Cepa 69 (19F); Ensayos a 1 µg/ml. Control PBS: □ y PBS_{DTT}: ■; LytA: ●; Skl: ●; QLAS1: ●; QSLA2: ●. Los datos son representativos de tres medidas independientes con tres réplicas cada una. (ANOVA de una vía y LSD de Fisher como test *post hoc*; **: $p \leq 0,01$ y ***: $p \leq 0,001$).

RESULTADOS

Por otra parte, se ensayó la posible letalidad de las quimeras sobre la cepa B6 de *S. mitis*, sin observar ningún efecto aparente a la concentración ensayada (1 µg/ml; datos no mostrados), y también sobre la cepa SK137 (portadora del fago atemperado ΦSK137 que codifica para Skl), con el fin de comprobar si el módulo catalítico de Skl presentaba algún tipo de preferencia por la pared bacteriana de esta cepa, con independencia del CBM que lo acompaña. Como se muestra en la **Figura 4.2.12**, la actividad bacteriolítica y bactericida de QSLA2 sobre esta cepa de mitis es muy inferior a la observada en la mayoría de cepas de neumococo; nula en el caso de QLAS1 y muy baja en el caso de LytA.

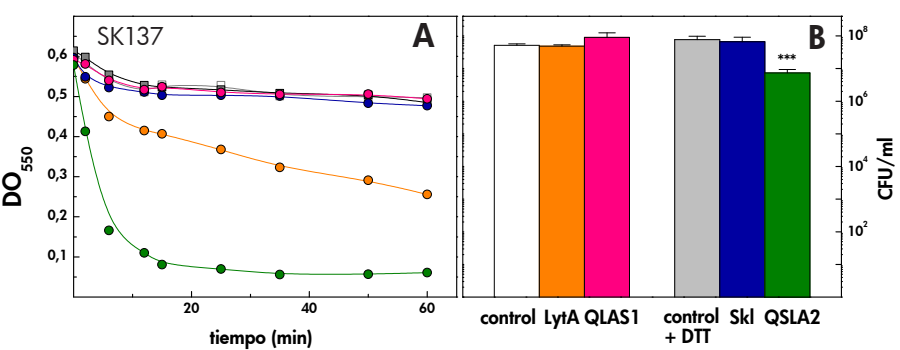


Figura 4.2.12. Efecto bacteriolítico/bactericida de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2 frente a la cepa SK137 de *S. mitis*. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo detallado en la **Figura 4.2.7**. Control PBS: □ y PBS_{DTT}: ■; LytA: ○; Skl: ●; QLAS1: ●; QSLA2: ●. (Los datos son representativos de tres medidas independientes con tres réplicas cada una. ANOVA de una vía y LSD de Fisher como test *post hoc*; *** : $p \leq 0,001$).

En la **Tabla 4.2.7** se muestra un resumen de los experimentos de viabilidad celular con las distintas cepas ensayadas. QSLA2 es activa sobre todas ellas, exceptuando *S. mitis* B6, y mostró mayor actividad bactericida que LytA en las cepas donde ésta también era capaz de disminuir la viabilidad (*S. pneumoniae* R6 y D39) en las condiciones de los ensayos.

Tabla 4.2.7. Actividad bactericida de las quimeras y sus enzimas parentales sobre distintas cepas de *S. pneumoniae* y *S. mitis*.

Cepa (serotipo)	Disminución de la viabilidad tras tratamiento con			
	Skl	LytA	QLAS1	QSLA2
<i>S. pneumoniae</i>				
R6	(-) -	(+) +	-	(+++) ++++
D39 (2)	(-)	(++)	ND	(+++)
P007 (3)	-	-	ND	++
P008 (4)	-	-	-	++
69 (19F)	-	-	ND	+
48 (23F)	-	-	-	++++
<i>S. mitis</i>				
B6	-	-	-	-
SK137	-	-	-	+

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo detallado en la **Figura 4.2.7**. Las medidas se realizaron a una concentración de enzima de 1 µg/ml, excepto en los resultados entre paréntesis, que indican medidas a 0,25 µg/ml. El símbolo - indica sin efecto; +, ++, +++ y ++++ indican disminución de la viabilidad (CFU/ml) de 1, 2, 3 ó 4 log, respectivamente; ND: no determinado.

El resultado más interesante y prometedor lo ofrece QSLA2 con la cepa multiresistente 48 (23F), ya que es la única capaz de matarla eficazmente (disminución de 4 log en la viabilidad) con una única dosis de 1 µg/ml.

4.2.3.c. Determinación de CMI

La diferencia en la actividad bactericida de LytA y QSLA2 se confirmó determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ambas enzimas frente a la cepa de neumococo ATCC® 49619™, utilizada como referencia en ensayos de susceptibilidad, mediante el método de microdilución descrito en el apartado 3.2.6.c de Materiales y Métodos. Las CMIs estimadas fueron 4 µg/ml para LytA y 0,5 µg/ml para QSLA2 (Figura 4.2.13).

Además de mejorar el valor de la CMI con respecto a LytA, la concentración de QSLA2 necesaria para evitar el crecimiento de esta cepa es más de 30 veces menor que la de Cpl-1 (16 µg/ml), considerada la endolisina natural más eficaz contra neumococo hasta fecha, e incluso con respecto a la quimera Cpl-711 (4,5 µg/ml) diseñada para mejorar la eficacia de Cpl-1 (Díez-Martínez *et al.*, 2015).

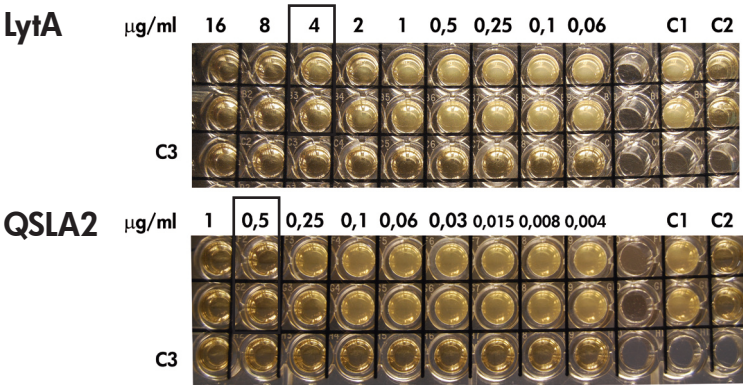


Figura 4.2.13. Determinación de la CMI de LytA y QSLA2 frente a la cepa ATCC® 49619™- (serotipo 19F) de *S. pneumoniae*. CMI de cada enzima señalada con recuadro. Los ensayos se realizaron por triplicado según el método de microdilución aprobado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), y se procedió a su evaluación tras 24 h de incubación a 37°C. C1: control de crecimiento, medio más bacterias, sin enzima; C2: control de esterilidad, sólo medio; C3: control medio más enzima, sin bacterias. Los ensayos con QSLA2 se realizaron en presencia de DTT 0,25 mM.

4.2.3.d. Actividad “*in vivo*” sobre peces cebra

La capacidad de la enzima quimérica QSLA2 para proteger frente a la infección por *S. pneumoniae* se evaluó *in vivo* utilizando embriones de peces cebra como modelo animal de infección. Como primer paso del estudio se realizó un ensayo de toxicidad aguda para determinar la bioseguridad de QSLA2, que se llevó a cabo mediante la exposición de los embriones a diferentes concentraciones de la enzima, suplementadas con DTT 1 mM (necesario para su actividad). Los resultados mostraron que a las concentraciones de 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, una vez transcurridas 96 h, había entre un 14,3 y 7,4 % de mortalidad respectivamente. No se observó ningún signo de toxicidad a ninguna de las otras concentraciones ensayadas (Figura 4.2.14). En paralelo se realizaron controles negativos y positivos de toxicidad en los que las bacterias fueron tratadas con medio E3 o 3,4-dicloroanilina, respectivamente.

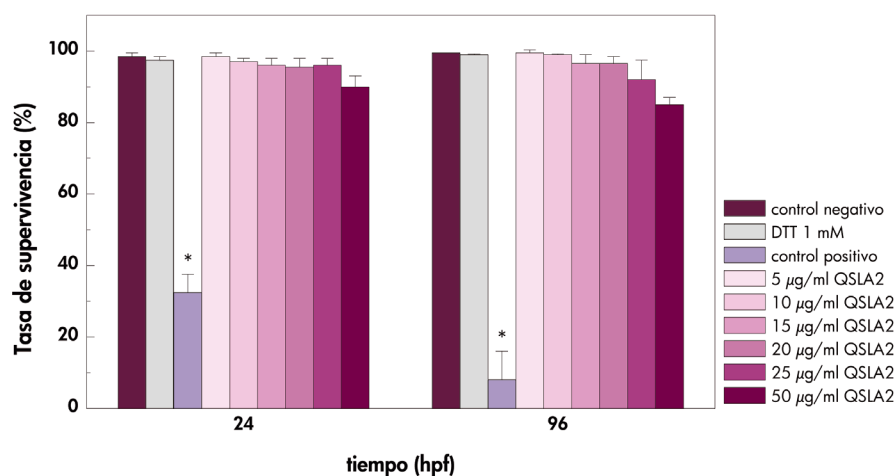


Figura 4.2.14. Ensayo de toxicidad aguda de QSLA2 en embriones de pez cebra.

Ensayo de toxicidad aguda para determinar la mortalidad en embriones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de QSLA2 durante 96 h. Se monitorizaron malformaciones graves y muerte. La tasa de supervivencia se presenta como el porcentaje (media \pm desviación estándar) de los embriones que sobreviven en cada punto de tiempo y se determinó a través de tres réplicas de 20 embriones/condición cada una. Control negativo: medio E3. DTT 1 mM: control negativo más 1 mM DTT. Control positivo: 3,4-dicloroanilina. QSLA2 se añadió en todos los casos acompañada de 1 mM de DTT. Los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en la comparación de los embriones tratados con QSLA2 o 3,4-dicloroanilina con respecto a los controles. Se aplicó el test de ANOVA de una vía, seguido de un test de Dunnet; *: $p \leq 0,001$ en comparación con los controles.

RESULTADOS

Una vez determinado el rango de concentraciones no tóxicas, se procedió a evaluar el potencial de QSLA2 como agente antimicrobiano. Para la infección, los embriones se pusieron en contacto con $\approx 10^8$ CFU/ml de la cepa D39 de *S. pneumoniae* (**Figura 4.2.15**) mediante la técnica de inmersión (8 h a 28,5 °C), usando como control negativo bacterias muertas por calor. Posteriormente, se lavaron los embriones con medio E3 para eliminar completamente al patógeno y se trataron con una única dosis de QSLA2 a las concentraciones indicadas, o el volumen correspondiente de PB, como se detalla en el **apartado 3.2.7** de Materiales y Métodos.

Los resultados del ensayo de supervivencia muestran que QSLA2 a 20 $\mu\text{g/ml}$ es capaz de proteger al 100% de los embriones frente a una infección de la cepa D39, perdiendo eficacia a concentraciones menores ya que la tasa de supervivencia a 5 $\mu\text{g/ml}$ es únicamente un 16,08% superior a la del control positivo con D39. A 25 $\mu\text{g/ml}$ también es capaz de proteger el total de los embriones, ya que la caída del 7,4% con respecto al control es debida a la toxicidad de la proteína.

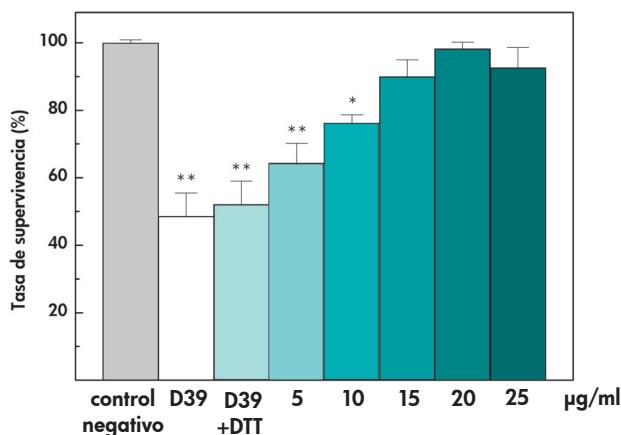


Figura 4.2.15. Protección de embriones de pez cebra por QSLA2 contra la infección por *S. pneumoniae*. Supervivencia de los embriones de pez cebra infectados con la cepa D39 de *S. pneumoniae*, tratados (o no) con diferentes concentraciones de QSLA2 a las 8 h de infección. La tasa de supervivencia se representa como el porcentaje (media \pm desviación estándar) de los embriones que sobreviven transcurridos 4 días después de la infección y se determinó a través de tres réplicas de 60 embriones/condición cada una. Los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en la comparación de los embriones infectados o tratados con QSLA2 con respecto a los controles. Se aplicó el test de ANOVA de una vía y el test de Dunnet como test *post hoc*; * : $p \leq 0,01$, y ** : $p \leq 0,001$.

DISCUSIÓN

5

DISCUSIÓN

5

Como ya se ha indicado en la Introducción, el hecho de que *S. pneumoniae* sea uno de los principales patógenos humanos, junto a la creciente aparición de cepas resistentes a los antibióticos y la eficacia parcial de las vacunas existentes en ciertos grupos de riesgo, hacen urgente la necesidad de buscar nuevas estrategias para combatir las infecciones originadas por esta bacteria, que es el primer agente causal de la neumonía adquirida en la comunidad y de otras patologías no invasivas como meningitis, sepsis u otitis media.

En este escenario, el uso como antibacterianos (enzibióticos) de las enzimas líticas del PG supone una novedad en el modo de acción respecto a los antibióticos tradicionales. Aunque algunos de éstos también explotan el hecho de que el PG es una estructura fundamental para la supervivencia de las bacterias, actúan interfiriendo en la síntesis de la misma, mientras que las lisinas catalizan directamente su destrucción. Este nuevo modo de actuar evita el problema de las resistencias actuales y dificulta el desarrollo de otras nuevas, ya que la estructura del PG está altamente conservada entre todas las bacterias, y su modificación para evadir la acción de las lisinas podría resultar comprometedor para la fisiología y/o la supervivencia bacteriana (Loeffler *et al.*, 2001; Schuch *et al.*, 2002). Así, existen estudios en los que se muestra que, bajo las mismas

condiciones, las bacterias son más propensas a desarrollar resistencias a los antibióticos convencionales que a las lisinas (Gilmer *et al.*, 2013). En el único caso descrito de desarrollo de mecanismos de resistencia a un enzibiótico (lisostafina), las bacterias mostraron una marcada reducción de su virulencia, y/o sensibilidad o hipersusceptibilidad a antibióticos a los que eran resistentes (Kusuma *et al.*, 2007). Las enzimas líticas del PG ofrecen, además, la posibilidad de emplearse solas o en combinación con otras lisinas, o incluso antibióticos tradicionales, para potenciar su acción de forma sinérgica.

Las enzimas líticas del PG de neumococo dependientes de colina tienen, además, la ventaja de ser muy específicas en cuanto a las especies sobre las que actúan. Pueden observarse incluso diferencias en su eficacia según las cepas o el serotipo de las mismas (Díez-Martínez *et al.*, 2015; Blázquez *et al.*, 2016), con lo que se minimiza el problema de dañar la flora bacteriana comensal o la aparición de resistencias cruzadas. La posibilidad de utilizar tanto las lisinas provenientes de *S. pneumoniae* como las de otras especies relacionadas estrechamente, como *S. mitis*, o las de los bacteriófagos que las infectan abre un abanico de posibles variantes en función tanto de su capacidad de unión a la pared bacteriana como de las distintas actividades de sus módulos catalíticos. La amidasa Skl codificada por el fago Φ SK137 de *S. mitis* se eligió como objeto de estudio al tener un dominio catalítico amidasa tipo CHAP diferente del dominio amidasa más habitual en las enzimas codificadas por neumococo y sus bacteriófagos (Amidasa_2), y además asociado a un CBM, lo que le permite poder unirse a la pared celular de neumococo y de otros patógenos que contengan colina en su envuelta celular.

Mediante la utilización combinada de diversas técnicas bioquímicas, biofísicas y bioinformáticas se ha caracterizado la estructura, estabilidad y actividad antibacteriana de la amidasa Skl y de las lisinas quiméricas construidas mediante el intercambio de los módulos catalítico y de unión a colina de Skl y LytA, la autolisina mayoritaria de neumococo. También se han estudiado comparativamente la interacción de todas ellas con colina y los cambios estructurales derivados del reconocimiento de este amino alcohol.

5.1. Estructura tridimensional de Skl

5.1.1. Módulo catalítico (N-Skl)

El módulo N-terminal de Skl se ha identificado como un dominio CHAP con actividad N-acetilmuramoyl-L-alanil-amidasa. La combinación del modelado por homología de su estructura 3D con la construcción y caracterización de mutantes ha permitido establecer el plegamiento del dominio, la localización del sitio activo y de los principales aminoácidos catalíticos (Cys31 e His92), así como identificar otros residuos conservados que podrían ser importantes para la catálisis y/o el reconocimiento del sustrato.

El modelo generado muestra el plegamiento característico de la familia CHAP, con una lámina- β antiparalela de seis hebras flanqueada por tres hélices- α (**Figura 4.1.9**). Estudios teóricos basados en análisis de secuencias y predicción de estructura secundaria sugieren que el dominio CHAP podría formar parte de la superfamilia de proteínas NIPc/P60 (Anantharaman & Aravind, 2003), en la que los elementos de estructura estrictamente conservados comprenderían la hélice- α en cuyo extremo se sitúa la cisteína catalítica (precedida usualmente por un residuo polar) y un motivo central formado por dos hebras- β , en la segunda de las cuales se sitúa la histidina catalítica, seguidas de otras dos hebras- β situadas en posición C-terminal. En la primera de estas cuatro hebras aparece un residuo polar conservado cuya función sería, como en otras tiol-proteasas, orientar la histidina catalítica y estabilizar su carga (Walsh, 1979). El alineamiento de secuencias dentro de la familia CHAP y la posición respecto a los aminoácidos catalíticos en el centro activo indican que en Skl el residuo polar que precede a la cisteína catalítica sería la Gln30, y el encargado de estabilizar la carga de la histidina catalítica sería el Glu109, propuesto, junto con la Cys31 y la His92, como componente de una triada catalítica. En el modelo propuesto para N-Skl estos residuos están orientados en el orden de secuencia y topología típicos del clan CA de las peptidasas (véase también **Figura 8.2**).

De acuerdo con el análisis *in silico*, las mutaciones C31A y H92A resultaron en la pérdida de actividad catalítica, sin que se modificase la estructura de los mutantes con respecto a la enzima silvestre, como indicaban la elevada similitud entre los respectivos espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano y cercano, el patrón de sedimentación en ausencia y en presencia de colina, y la estabilidad frente a la temperatura. Las pequeñas

diferencias observadas en los espectros del DC en el UV-lejano podrían reflejar una pequeña alteración en el entorno de la Tyr90, cercana a la Cys31 y a la His92. La inestabilidad estructural mostrada por el mutante E109A y su falta de retención en la columna de DEAE-celulosa indican que la sustitución de este residuo por alanina tiene una influencia dramática en el plegamiento de la proteína, por lo que fue imposible investigar su posible participación en la catálisis. El análisis de la estructura del dominio CHAP de la proteína PcsB de *S. pneumoniae* (**Figura 1.12 C**) muestra que el residuo Glu360, equivalente al Glu109 de Skl, está implicado en la formación de una red de puentes de hidrógeno en la que, además de la histidina catalítica (His343), participarían también la His372 y la Arg373, que a su vez interactúa con el Glu383, todos ellos situados en el lazo que conecta las hebras $\beta 3$ y $\beta 4$ (Bartual *et al.*, 2014). La hipotética participación del Glu109 de Skl en una red de contactos importante para el mantenimiento de la estructura de N-Skl podría explicar la inestabilidad del mutante E109A, pero la verificación de esta hipótesis requiere la resolución de la estructura de N-Skl a alta resolución. No obstante, el examen del modelo de N-Skl indica que el carboxilo de la cadena lateral del Glu109, situado en la hebra- $\beta 4$, estaría a distancia de puente de hidrógeno del nitrógeno de la His92 y del grupo -NH de la Arg130 (equivalente a la Arg373 de PcsB), situada en la hebra- $\beta 5$ (**Figura 5.1**).

La actividad de Skl sobre paredes de neumococo purificadas es, por otro lado, dependiente de Ca^{2+} . Aunque no se requiere su adición para alcanzar la actividad óptima, la presencia de EDTA (o EGTA) en el medio tiene un efecto inhibitorio, que se revierte totalmente al añadir Ca^{2+} y parcialmente con Mn^{2+} y Mg^{2+} . El Zn^{2+} , por el contrario, inhibe la actividad (Llull *et al.*, 2006). La estructura del dominio CHAP_K (endolisina LysK del bacteriófago K de *S. aureus*) (**Figura 1.12**) muestra dos iones metálicos: un Ca^{2+} en la región N-terminal con coordinación pentagonal (mediada por dos residuos ácidos y dos aromáticos pertenecientes al lazo que conecta las dos primeras hélices y otro residuo ácido situado a dos posiciones de la Cys catalítica (**Figura 5.2**), y un ion Zn^{2+} coordinado con el grupo sulfhidrilo de la cisteína catalítica, una molécula de tampón MES y varias moléculas de agua (Sanz-Gaitero *et al.*, 2014). El dominio $\text{CHAP}_{\text{GH15}}$ (lisina LysGH15 de estafilococo), prácticamente idéntico en cuanto a secuencia y estructura a CHAP_K , también presenta un Ca^{2+} en la misma posición y coordinado por los mismos residuos (**Figura 5.2**), pero no se ha observado la presencia de Zn^{2+} (Gu *et al.*, 2014).

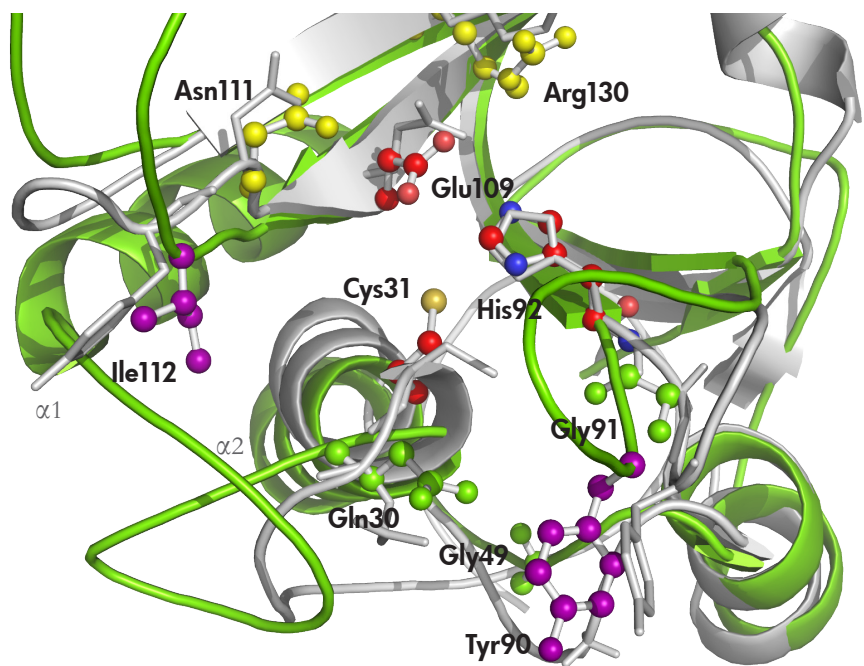


Figura 5.1. Cavity catalítica de Skl. Superposición del modelo de N-Skl (en verde) con la estructura del molde 2K3A (en gris) con los aminoácidos relevantes para la catálisis (representación de esferas y varillas) numerados según la secuencia de Skl. En rojo, los aminoácidos de la triada catalítica; en amarillo los implicados en la estabilización de la carga del centro activo; y en morado, los que flanquean la entrada al mismo. Los residuos que podrían contribuir a estabilizar el intermedio aniónico durante la catálisis (véase **Figura 5.3**) se muestran en verde. Los aminoácidos equivalentes del molde 2K3A se muestran en modelo de bastones grises.

	1	10	20	30
N-Skl (Q3BLW5)	-----MSKKQEMIQFFIDKANA-----	-----GDGVNDNGAYGFQCA	ADVP	CY
CHAP _K (Q6Y7T6)	MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAI	IDADGYYHAQCQ	DLITD	
CHAP _{GH15} (D6QY02)	MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRIKKATSYDPSFGVMEAGAI	IDADGYYHAQCQ	DLITD	
CHAP _{PlyTW} (O56788)	-----MKTLLQAESYIKSKVNT-----	-----GTFDGLYGYQCM	DLAVD	
Conservación CHAP _K
Conservación CHAP _{GH15}
Conservación CHAP _{PlyTW}	*	*	*

Figura 5.2. Alineamiento de secuencias de N-Skl y otros dominios CHAP. El alineamiento de la región N-terminal de los dominios CHAP con N-Skl se ha realizado con MUSCLE. En azul, los residuos responsables de la unión de Ca²⁺ en CHAP_K y CHAP_{GH15}. Tres de ellos están también conservados y señalados en CHAP_{PlyTW} y N-Skl. La estrella amarilla señala la Cys catalítica. Los símbolos en negro, rojo y verde indican la identidad de secuencia (*), cambios conservativos (:) y semi-conservativos (.) con respecto a CHAP_K, CHAP_{GH15} y CHAP_{PlyTW} respectivamente. La numeración corresponde a la secuencia de Skl.

Mientras que en CHAP_K se ha propuesto solo un papel estructural para el Ca²⁺ (mantenimiento del plegamiento y orientación de los residuos catalíticos) basándose en su efecto sobre la estabilidad de la enzima pero no en la actividad (Filatova *et al.*, 2010), su unión a CHAP_{GH15} es esencial para la actividad, aunque su contribución podría también ser de carácter estructural (Gu *et al.*, 2014).

El modelo propuesto de N-Skl no presenta un lazo tan largo como el de CHAP_{GH15} o CHAP_K para albergar el calcio entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (**Figura 1.12 B y D** y **Figura 5.1**). Sin embargo, tres de los cinco residuos responsables de la unión del calcio a CHAP_K y CHAP_{GH15} se encuentran conservados en N-Skl (Asp22, Asp24 y Asp33) y lo mismo ocurre en el dominio CHAP_{PlyTW} de la endolisina del fago Twort (PlyTW) (**Figura 5.2**), cuya actividad anti-estafilocócica es asimismo dependiente de Ca²⁺ (Becker *et al.*, 2015). La mutación de estos tres residuos a alanina elimina la actividad bactericida tanto en CHAP_K como en CHAP_{GH15}, mientras que los otros dos residuos que coordinan el Ca²⁺ (Tyr e His) no parecen ser tan importantes (Sanz-Gaitero *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2014). Estos resultados, en su conjunto, sugieren que el dominio CHAP de Skl podría también unir un catión Ca²⁺, necesario para su actividad óptima y susceptible de ser eliminado con EDTA, pero son necesarios más experimentos para confirmarlo. Por otro lado, la coordinación de un ion Zn²⁺ por la cisteína catalítica, como ocurre en CHAP_K, podría explicar la inhibición de la actividad por este catión (Llull *et al.*, 2006).

5.1.1.a. Centro activo y mecanismo catalítico

Según el mecanismo de acción propuesto para las tiol-proteasas (**Figura 5.3**; Walsh, 1979), en Skl, el Glu109 aceptaría un protón del grupo imidazol de la His92, que funcionaría como base general desprotonando a la Cys31 (grupo nucleófilo), que atacaría a su vez al carbono del enlace amida entre el residuo de MurNAc y la L-Ala que conecta las partes glicánica y peptídica del PG. Se formaría así un intermedio tetraédrico (**Figura 5.3 B**) que liberaría el extremo amino terminal del péptido (R₂NH₂ en la **Figura 5.3 C**). A continuación, la enzima sería desacilada por una molécula de agua (**Figura 5.3 D**), liberando el carboxilo del grupo lactilo del MurNAc (R₁COOH en **Figura 5.3 E**) y retornando a su estado inicial, preparada para aceptar una nueva molécula de sustrato. Durante el proceso, la carga positiva de la His92 se estabilizaría a través de la formación de un puente de hidrógeno con el Glu109.

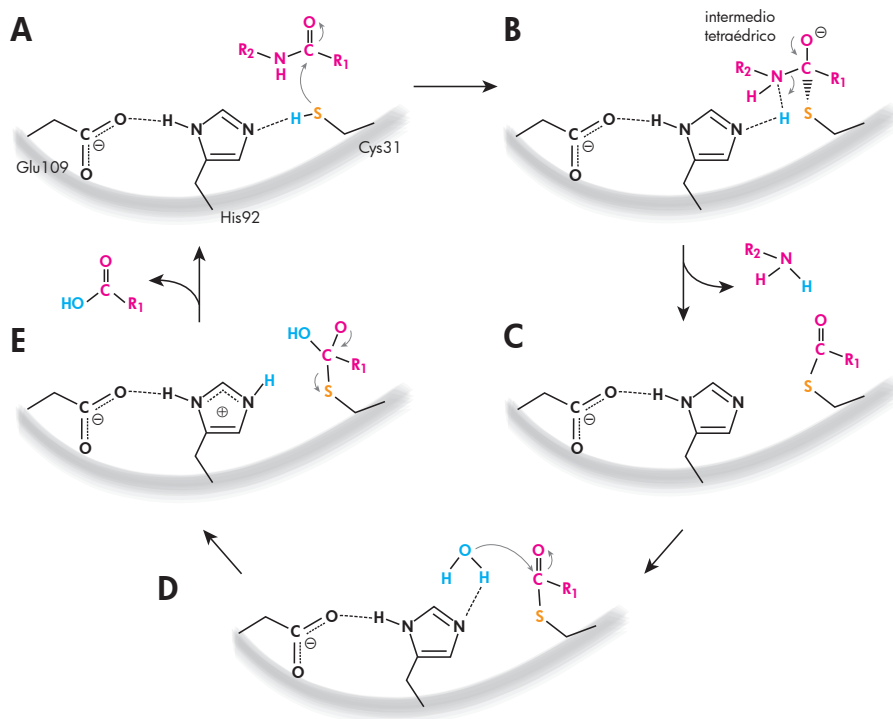


Figura 5.3. Mecanismo catalítico propuesto para Skl. (A) El Glu109 atrae un protón del grupo imidazol de la His92, lo que hace que ésta atraiga el protón del grupo sulfhidrilo de la Cys31. La Cys31 así es capaz de efectuar un ataque nucleofílico sobre el enlace amida del sustrato (R_2NHCOR_1 ; R_1 y R_2 representan la parte glicánica y peptídica del sustrato, respectivamente), formando un intermedio tetraédrico (B). (C) La reacción de transacilación libera la parte peptídica del sustrato (R_2NH_2) y origina un intermedio acil-enzima. (D) y (E) Este intermedio se hidroliza para liberar el otro extremo del sustrato hidrolizado (R_1COOH), retornando así la enzima a su estado inicial, lista para aceptar un nuevo sustrato. El sustrato se representa en magenta; el átomo de azufre de la Cys31 en amarillo; y en cian los átomos de hidrógeno y el oxígeno implicados en la reacción de hidrólisis. Las flechas grises indican los movimientos electrónicos durante el transcurso de la reacción y las líneas discontinuas los enlaces parciales.

En el dominio CHAP de SSP0609 de *S. saprophyticus*, (Rossi *et al.*, 2009), utilizado como molde principal en la construcción del modelo de N-Skl, estaría conservada la triada catalítica, formada por los residuos Cys57, His109 y Glu126 (Figura 5.1).

La presencia de un tercer residuo implicado en la catálisis se ha comprobado también en otros dominios CHAP de estructura conocida,

como el de la proteína PcsB de *S. pneumoniae* (Bartual *et al.*, 2014), CHAP_K (Sanz-Gaitero *et al.*, 2014) o CHAP_{GH15} (Gu *et al.*, 2014). En todos ellos, la mutación de los residuos cisteína e histidina a alanina elimina la actividad enzimática, mientras que la del glutámico sólo la disminuye, pudiendo depender la caída de la actividad del tipo de sustrato utilizado (paredes aisladas o bacterias) (Bartual *et al.*, 2014; Sanz-Gaitero *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2014). Un triplete similar de residuos se encuentra formando la triada catalítica en la familia C15 del clan de las tiol-peptidasas (Sokabe *et al.*, 2002).

Tanto en SSP0609 como en Skl, el sistema de estabilización de la carga de la histidina podría incluir un residuo polar adicional: la Asn111 (Asn128 en SSP0609), que se encuentra conservada en la familia CHAP, y que jugaría un papel estabilizador, por transferencia de la carga del centro activo a través del Glu109 (Glu126 de SSP0609), aunque sin participar directamente en la catálisis (Rossi *et al.*, 2009) (**Figura 5.1**). De hecho, la mutación a alanina del residuo equivalente (Asn136) en los dominios CHAP_K y CHAP_{GH15} provoca la reducción de la actividad, aunque no su eliminación, apoyando el papel propuesto para el mismo (Sanz-Gaitero *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2014).

Entre los grupos de la cavidad catalítica que podrían contribuir a estabilizar el intermedio aniónico en Skl estarían la Gln30 (Gln56 en SSP0609) que precede a la cisteína catalítica, y/o los grupos NH de la cadena principal de la Gly49 y la Gly91 (Gly74 y Gly108 en SSP0609), todos ellos conservados dentro de familia (Rossi *et al.*, 2009) (**Figura 5.1 y 8.1**).

Basándose en la conservación de secuencia, algunos autores han señalado también la importancia de un aspártico adicional, situado entre 9 y 20 aminoácidos antes de la histidina catalítica, para la actividad catalítica de los dominios CHAP (Layec *et al.*, 2008; Rigden *et al.*, 2003). Sin embargo, tanto en Skl como en los dominios CHAP de estructura conocida (PlyC, PcsB, CHAP_K, CHAP_{GH15} o GspS, entre otros) no hay ningún residuo ácido conservado en la posición indicada (ocupada en Skl por el Trp76) y su alejamiento del centro activo no parece apoyar su participación en la catálisis (McGowan *et al.*, 2012; Bartual *et al.*, 2014; Sanz-Gaitero *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2014; Pai *et al.*, 2006).

Finalmente, en la proteína molde SSP0609 se ha visto que la entrada a la cavidad del centro activo está flanqueada por dos residuos aromáticos: Tyr107 y Tyr129. La Tyr107, conservada en más de un 90% de los

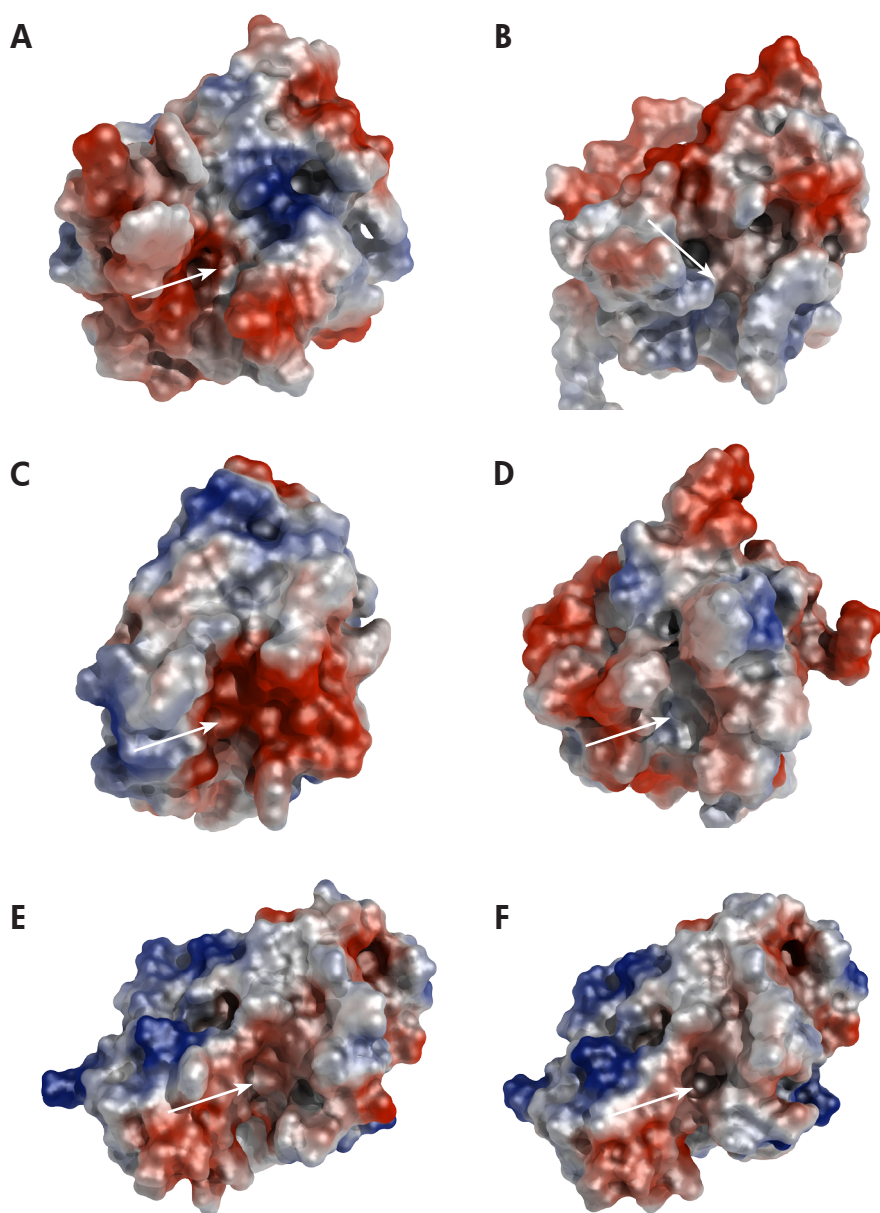


Figura 5.4. Superficie de potencial electrostático en diferentes dominios CHAP. (A) Modelo de N-Skl; (B) CHAP de SSP0609 (PDB:2K3A); (C) CHAP de PscB (PDB: 4CGK); (D) lisina PlyC (PDB: 4F88); (E) dominio CHAP_K (PDB: 4CSH); (F) dominio CHAP_{GH15} (PDB: 4OLK). Potencial electrostático generado con PyMol. Azul: carga positiva; rojo: carga negativa. Las flechas señalan la posición de la cisteína catalítica dentro de la cavidad. La orientación de los dominios es la misma que en la **Figura 1.12**.

dominios CHAP codificados por bacterias del filo Firmicutes (Rossi *et al.*, 2009), está presente también en CHAP_K (Tyr140) (Sanz-Gaitero *et al.*, 2014) y en Skl (Tyr90), mientras que la Tyr129, conservada como residuo de tipo aromático o hidrofóbico en la familia (~70% Tyr y 30% Trp/Val), está sustituida en Skl por un residuo hidrofóbico (Ile112) (**Figura 5.1**). Se ha propuesto que estos aminoácidos podrían contribuir al reconocimiento y anclaje del sustrato, con lo que su variabilidad podría conferir diferentes especificidades frente a distintos tipos de sustratos (Rossi *et al.*, 2009). Como se muestra en la **Figura 5.4 A**, la cavidad catalítica de Skl estaría definida por residuos de tipo polar, con una distribución no homogénea del potencial electrostático negativo y positivo. Los lazos que conectan las hebras $\beta 2$ y $\beta 3$, por un lado, y las hebras $\beta 4$ y $\beta 5$, por otro, formarían una especie de raíles a ambos lados del centro activo que, posiblemente contribuyan a orientar y anclar el sustrato. Tanto el tipo de residuos que forman la cavidad como la forma y accesibilidad de la misma varían notablemente de unos dominios CHAP a otros, como ponen de manifiesto las estructuras actualmente resueltas (**Figura 5.4**)

5.1.2. Módulo de unión a colina (C-Skl)

El módulo C-terminal de Skl se ha identificado como un dominio de unión a colina o CBM. La construcción de un modelo a alta resolución con evaluación favorable tanto energética como estructuralmente (**apartado 4.1.3.b**) se ha visto favorecida por la alta identidad y cobertura de secuencia con el molde empleado, que consta del mismo número de repeticiones que C-Skl (**Figura 4.1.13**). El modelo muestra la misma estructura que el CBM de LytA, compuesta de 7 horquillas- β , organizadas formando una superhélice a izquierdas (**Figura 4.1.15**). Además, los aminoácidos responsables de la unión de colina, tanto en los cinco sitios canónicos (*sitios 2 a 6*) como en el no canónico (*sitio 1*), están conservados en secuencia y posiblemente también en la estructura, con lo que es muy probable que el CBM de Skl sea capaz de albergar el mismo número de moléculas de colina que el de LytA.

5.1.2.a. Reconocimiento de colina

Las curvas de la valoración de Skl con colina obtenidas por DC demuestran la existencia de dos clases de sitios de unión con diferente afinidad hacia el ligando, siendo la unión a los sitios de menor afinidad la que promueve la dimerización de Skl, que tiene lugar a concentraciones de colina

muy superiores a las requeridas por otras CBPs, incluida LytA (Usobiaga *et al.*, 1996; Medrano *et al.*, 1996; Varea *et al.*, 2000; Varea *et al.*, 2004; Monterroso *et al.*, 2008). A pesar de que los residuos implicados en la unión de colina a LytA se encuentran conservados en la secuencia de Skl (Tabla 4.1.7) y de la gran similitud de secuencia que hay entre C- Skl y C-LytA, la afinidad de colina por Skl ($K^{1}_{0,5 \text{ app}} \sim 1\text{mM}$; $K^{2}_{0,5 \text{ app}} \sim 100 \text{ mM}$) es entre dos y quince veces inferior a la de los sitios respectivos de LytA ($K^{1}_{0,5 \text{ app}} = 0,63 \text{ mM}$; $K^{2}_{0,5 \text{ app}} = 6,5 \text{ mM}$), cuya dimerización, a diferencia de Skl, está mediada por la saturación de los sitios de mayor afinidad (Usobiaga *et al.*, 1996). Estas diferencias podrían ser debidas, en principio, a cambios puntuales en la secuencia que disminuyan la afinidad intrínseca del sitio o sitios afectados, y/o a la menor estabilidad de los dímeros formados en presencia de colina. Según el modelo construido para C-Skl (apartado 4.1.3.b1), la unión de colina a Skl no estaría impedida por condicionamientos estéricos.

Aunque los CBMs de QLAS1 y QSLA2 difieren, respectivamente, de C-Skl y C-LytA en solo cinco aminoácidos y de que solo uno de estos cambios no es conservativo (Figura 5.5), la afinidad por colina y/o la cooperatividad del proceso de unión a colina de las quimeras diverge claramente del comportamiento mostrado por el correspondiente CBM en la enzima parental. Así, aunque las constantes aparentes de unión a colina de los dos tipos de sitios existentes en QSLA2 son similares a los de LytA (Tabla 4.2.2), la saturación de los sitios de menor afinidad es



Figura 5.5. Alineamiento del linker y primeras repeticiones del CBM de Skl y LytA. Numeración según la secuencia de Skl. Se han subrayado los residuos del linker y la línea vertical señala dónde se ha realizado la fusión entre dominios para construir las quimeras. Los colores indican los aminoácidos implicados en la unión de cada una de las moléculas de colina (sitio 1 en azul, 2 en rojo, 3 en morado, 4 en naranja). El sitio 1 es el no canónico. La conservación de parte de la primera repetición del CBM de LytA en la quimera QLAS1 hace que su CBM y el de Skl difieran en 5 aminoácidos, aunque solo la sustitución de la Tyr154 de C-Skl por una treonina en QLAS1 tiene carácter no conservativo. Lo mismo ocurre, pero con el cambio inverso, en la quimera QSLA2 con respecto al CBM de LytA y, como ya se ha comentado en el modelo (apartado 4.1.3.b1) no habría impedimentos estéricos a la unión de colina.

mucho menos cooperativa en QSLA2, con un valor del índice de Hill de 1,3 en QSLA2 frente a 4,0 en LytA. Las divergencias son aún mayores entre QLAS1 y Skl, ya que la curva de valoración de la quimera indicaría la existencia de una sola clase de sitios de unión cuya afinidad aparente por colina ($K_{0,5 \text{ app}} = 22,9 \text{ mM}$) es intermedia a las de los sitios de mayor y menor afinidad de Skl. Este comportamiento podría indicar: *i*) que todos los sitios de unión tienen una afinidad similar en QLAS1, *ii*) la desaparición de una de las clases de sitios de unión, o *iii*) una disminución en la variación de la elipticidad asociada a la saturación de la primera clase de sitios de unión que no haga posible su detección.

Al estar localizadas en la primera repetición, las diferencias de secuencia entre el CBM de QLAS1 y C-Skl, o entre el CBM de QSLA2 y C-LytA, podrían afectar directamente tanto al sitio de unión no canónico como al primer sitio canónico, configurados ambos por residuos procedentes de la primera repetición de C-LytA y de C-Skl (**Figura 5.5**). Sin embargo, las diferencias en la afinidad por colina de las quimeras con respecto a los CBMs parentales, no solo muestran la gran influencia que un cambio minoritario y localizado en la composición de aminoácidos puede tener sobre la unión del ligando a los sitios directamente modificados, sino que pone de manifiesto la posibilidad de condicionar tanto la afinidad como la cooperatividad de la unión a los sitios secuencialmente conservados, evidenciando así la existencia de transmisión de información a lo largo de los CBMs.

Un comportamiento parecido se ha descrito para la quimera PL3, que comprende el módulo catalítico (Amidasa_5) y el linker y las dos primeras repeticiones de la endolisina Pal, codificada por el fago Dp-1 de *S. pneumoniae*, fusionados con las cuatro últimas repeticiones y la horquilla C-terminal de LytA (Blázquez *et al.*, 2016). Como en QSLA2, la modificación llevada a cabo en PL3 con respecto al CBD de Pal aumentó drásticamente la afinidad por colina y redujo la concentración de ligando necesaria para inducir completamente la dimerización (Blázquez *et al.*, 2016; Varea *et al.*, 2004), sin modificar apreciablemente la forma del dímero de PL3 con respecto al de Pal o LytA. Estos resultados evidencian, de nuevo, el papel que un cambio local en la secuencia de un CBM puede tener sobre la afinidad global del dominio por colina y, por tanto, en su capacidad de unión a la pared celular.

5.1.3. Organización modular

5.1.3.a. Monómero

Los estudios de SAXS y ultracentrifugación analítica muestran que en ausencia de colina Skl está presente en solución mayoritariamente como un monómero que es capaz de autoasociar para formar un dímero tras la unión del ligando y, posiblemente, algo de tetrámero. El modelo *ab initio* del monómero de Skl construido a partir de los datos de SAXS muestra una estructura alargada, ligeramente en “L” con una longitud máxima de 108 Å y en la que uno de los extremos presenta una forma algo más globular (**Figura 4.1.19**). La estructura es compatible con los modelos 3D generados para N-Skl y C-Skl, que se localizarían en los brazos corto y largo de la “L”, respectivamente, según el modelo de la estructura en solución generada para el mismo con SASREF (**Figura 4.1.20**). A pesar de contener un módulo catalítico perteneciente a la familia Amidasa_2, el monómero de LytA presenta una forma y un tamaño similares (Mellroth *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015) con una longitud máxima de unos 106 Å (Li *et al.*, 2015).

En LytA, el dominio catalítico (N-LytA) y el CBM (C-LytA) están unidos por un linker hidrofóbico de seis residuos (Li *et al.*, 2015) y la interfaz entre los mismos se estabiliza a través de una red de interacciones (**Figura 5.6**). Por una parte, el residuo Gly171 del linker forma un enlace

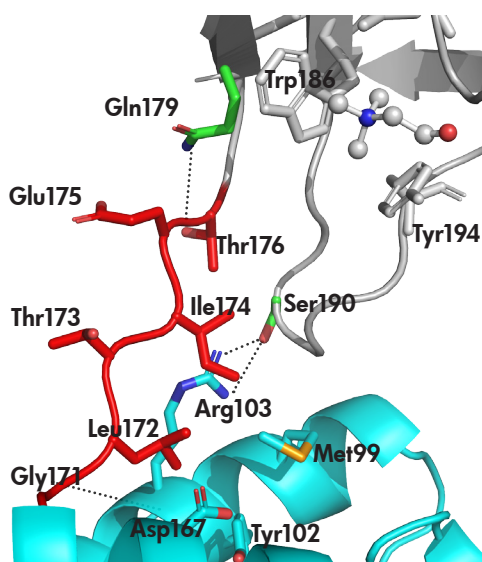


Figura 5.6.
Linker de LytA y contactos con el CBM y el módulo catalítico.

Se muestra el linker en rojo, (modelo de varillas), el CBM (C-LytA) en gris y el módulo catalítico (N-LytA) en azul. Los residuos de C-LytA y N-LytA que interactúan entre sí o con el linker se muestran en modelo de bastones y la molécula de colina unida al sitio no canónico en modelo de esferas y bastones. Las líneas de puntos indican los enlaces de hidrógeno.

de hidrógeno con el Asp167 de N-LytA y los residuos Leu172 e Ile174 interacciones hidrofóbicas con la Met99 y la Tyr102 de N-LytA, respectivamente. Además, la Thr176 del linker forma un enlace de hidrógeno con la Gln179 de C-LytA. Este residuo establece, a su vez, un enlace de hidrógeno con la cadena principal del Trp186 de C-LytA, implicado en la formación del sitio de unión a colina no canónico, situado en la interfaz de N-LytA y la primera repetición (*p1*) de C-LytA (Li *et al.*, 2015). Además, el oxígeno de la cadena principal de la Ser190 de C-LytA forma dos enlaces de hidrógeno con la cadena lateral de la Arg103 de N-LytA. A pesar de la red de enlaces formada, los residuos centrales del “linker” (Thr173 e Ile174) tienen factores de temperatura (B-factors) relativamente altos, lo que indica que la interacción entre dominios en LytA es, de alguna forma, dinámica (Li *et al.*, 2015). Al desconocer la estructura a alta resolución de Skl no existe información sobre los posibles contactos entre los dominios y el linker, previsiblemente formado por 7 residuos. No obstante, atendiendo al alineamiento de secuencias es posible establecer algunos paralelismos con LytA (**Figura 5.5** y **Figura 5.7**):

- los dos últimos aminoácidos del linker de LytA (Glu175 y Thr176) están presentes en el linker de Skl (Glu146 y Thr147), así como la Gln179 de C-LytA (Gln150 en Skl) con la que la Thr176 (Thr147 en Skl) forma un puente de hidrógeno.
- el Trp186 de C-LytA, clave en la formación del sitio de unión a colina no canónico y unido por un puente de hidrógeno a la Gln179, también está presente en Skl (Trp157).
- los tres aminoácidos aromáticos (Trp186, Tyr194, Tyr214) implicados en la formación del sitio no canónico de unión a colina de LytA estarían también conservados (Trp157, Tyr165, Phe185) en Skl, aunque la Phe185 equivaldría en la amidasa del fago a la Tyr214 de LytA.

La existencia de una interfaz estabilizada por interacciones múltiples entre los dos módulos de Skl, con posible participación del “linker”, sería consistente con el hecho de que solo se detecte una transición térmica mediante DSC en ausencia de colina, mientras que a concentraciones elevadas de ligando se observan dos transiciones; la primera de ellas posiblemente debida a la desnaturalización de N-Skl. Este comportamiento

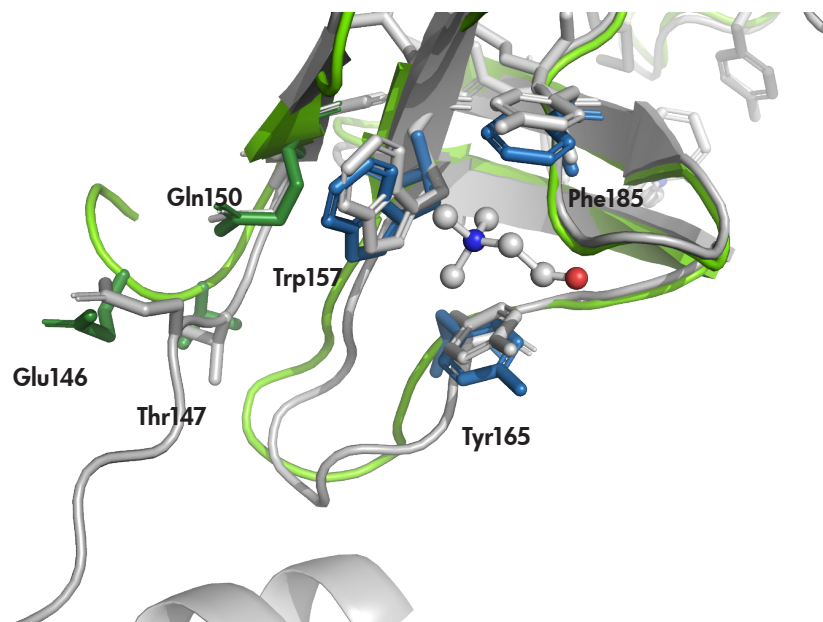


Figura 5.7. Detalle de la estructura del linker y la primera repetición del modelo de C-Skl. Superposición del modelo de C-Skl (en verde) con la estructura resuelta de LytA, en gris (Li *et al.*, 2015). Los residuos del sitio de unión a colina no canónico de Skl, los residuos conservados del linker, y sus equivalentes en LytA se han representado en modelo de bastones (azul, verde y gris respectivamente). La molécula de colina se representa en modelo de esferas y bastones; numeración de residuos según la secuencia de Skl.

indicaría que, debido a las interacciones entre módulos, la desnaturalización de N-Skl y C-Skl tiene lugar como un solo proceso cuando las temperaturas de transición de ambos módulos están muy próximas, mientras que el desplazamiento de la desnaturalización de C-Skl hacia temperaturas más altas inducido por la unión de colina daría lugar al desacoplamiento de ambos procesos y a la aparición de dos transiciones aparentemente cuasi-independientes (Brandts *et al.*, 1989; Luque *et al.*, 2002). El hecho de que las curvas de DSC de la quimera QSLA2 muestren una transición similar a la primera transición del complejo Skl/colina, apoya la atribución de la misma al dominio CHAP de Skl, compartido por ambas enzimas.

5.1.3.b. Dímero

La estructura en solución del dímero del complejo Skl/colina inferida a partir de los estudios de SAXS muestra una clara relación con la del dímero de LytA (Mellroth *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), tanto en la forma como en las propiedades hidrodinámicas de la partícula (Usobiaga *et al.*, 1996). Las diferencias observadas en los valores de $s_{20,w}$ (3,7 S *vs* 4,2 S) serían explicables por la diferencia de masa de los dímeros de Skl (67094 Da) y LytA (73089 Da), mientras que los valores de f/f_0 (1,62 *vs* 1,52) y R_g (44 Å *vs* 43 Å) indican desviaciones similares en la forma de la molécula con respecto a la partícula esférica equivalente y/o flexibilidades parecidas. La similitud de la región central del modelo del dímero de Skl obtenido con DAMMIF con la de las estructuras cristalográficas de los dímeros de C-LytA (Fernández-Tornero *et al.*, 2001; Mellroth *et al.*, 2014) y de LytA completa (Li *et al.*, 2015), o con la estructura esta última en solución (Mellroth *et al.*, 2014), indica que la dimerización de Skl también tiene lugar por el extremo C-terminal del CBM. Esta disposición es asimismo consistente con el pequeño tamaño (7 residuos) del “linker”, cuya longitud máxima, aun adoptando una configuración extendida (Ainavarapu *et al.*, 2007), no permitiría situar el extremo C-terminal del CBM en la proximidad del módulo catalítico, tal y como ocurre, por ejemplo, en la endolisina Cpl-1 (Hermoso *et al.*, 2003).

Como se indicó en el apartado 4.1.3.b2 de Resultados, la dimerización de LytA tiene lugar a través de la repetición *p6* y la horquilla- β C-terminal del CBM (Fernández-Tornero *et al.*, 2002; Varea *et al.*, 2000). Aunque la similitud de secuencia con la región correspondiente de Skl es elevada, las diferencias existentes y la resolución del modelo de SAXS no permiten descartar la existencia de disparidades en la superficie de dimerización de ambas lisinas. A este respecto, un factor importante para la configuración del dímero de LytA es la disposición de la horquilla- β C-terminal con respecto a la hélice beta formada por las repeticiones de C-LytA (**Figura 4.1.16**). Su posición viene determinada por la estructura del lazo que la conecta con la repetición *p6*, y la comparación de secuencias muestra la presencia en Skl de una alanina (Ala267) en el lugar de la prolina (Pro297) que tiene LytA al comienzo del lazo (**Figura 5.8** y **Figura 4.1.13**). Esta prolina podría ser importante para determinar la orientación relativa de las dos horquillas y los contactos entre las mismas. De hecho, se encuentra generalmente conservada en las amidasas codificadas por neumococo y sus bacteriófagos cuya dimerización

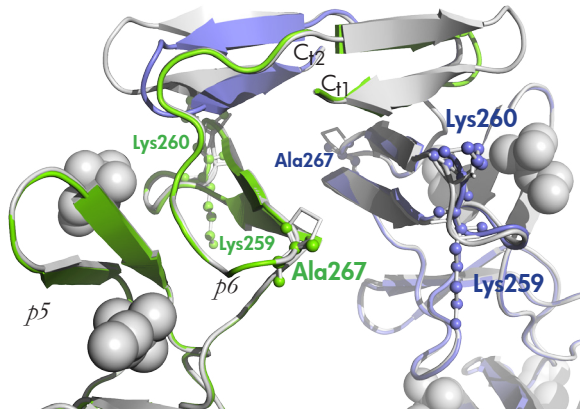


Figura 5.8. Disposición de la repetición *p6* y horquilla- β C-terminal en los dímeros de Skl y LytA. Detalle de la superposición del modelo del dímero de C-Skl₁ (C-Skl₁ en verde; C-Skl₂ en azul) con la estructura del dímero de LytA (en gris) (Mellroth *et al.*, 2014; PDB: 4IWT). Los residuos no conservados de las dos últimas repeticiones del CBM se representan en modelo de bastones y varillas (C-Skl) o en modelo de varillas (C-LytA) y podrían influir en la orientación de la horquilla C-terminal en C-Skl. Numeración de residuos según la secuencia de Skl. Las moléculas de colina se representan como esferas grises. C₁ y C₂ señalan el extremo C-terminal de cada CBM.

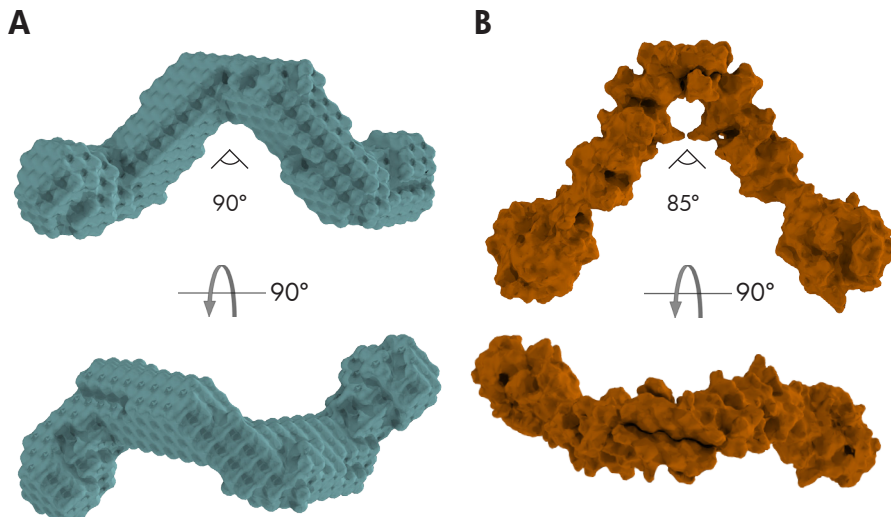


Figura 5.9. Comparación de las estructuras de los dímeros de Skl y LytA. (A) Estructura de Skl obtenida con DAMMIF a partir de los datos de SAXS; (B) Estructura de LytA de Li *et al.*, 2015 (PDB: 4X36)

tiene lugar a concentraciones de colina significativamente menores que las requeridas por Skl (Medrano *et al.*, 1996; Sáiz *et al.*, 2002; Varea *et al.*, 2004). Por otro lado, la presencia en la parte externa del giro que une las dos últimas horquillas de dos lisinas (Lys259 y Lys260) en las posiciones ocupadas por la Gly289 y la Thr290 de LytA podría influir, asimismo, en la orientación relativa de dichas horquillas. Cabe señalar que el ángulo entre monómeros en el modelo generado con DAMMIF para el dímero de Skl (**Figura 5.9**) parece algo mayor (90°) que el existente (85°) en la mayoría de las estructuras cristalográficas del dímero de LytA y C-LytA (Fernández-Tornero *et al.*, 2002; Mellroth *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015) o para la enzima completa en solución (Mellroth *et al.*, 2014). No obstante se ha reportado un ángulo de 110° para una de las estructuras cristalográficas de C-LytA resueltas (Fernández-Tornero *et al.*, 2002).

Los valores obtenidos para los coeficientes de sedimentación del monómero y el dímero de las quimeras QLAS1 (2,9 S y 4,0 S, respectivamente) y QSLA2 (2,7 y 4,0 S, respectivamente) al igual que los respectivos valores de R_s (30,4 Å y 44,7 Å para el monómero y el dímero de QLAS1; 42,1 Å para el dímero de QSLA2), son también consistentes con la conservación, en las quimeras, de las configuraciones en solución de las lisinas parentales.

5.2. Relaciones estructura-función: actividad lítica en paredes y bacterias

La delección de los 11 últimos residuos del LytA hace que la actividad sobre paredes de la forma troncada (P6) se reduzca en un 90 % con respecto a la enzima silvestre, sin que se vean notablemente reducidas ni la afinidad por colina ni la estabilidad de la estructura nativa, aunque provoca que el mutante P6 sea un monómero en presencia de colina (Varea *et al.*, 2000). Estos resultados mostraron, por primera vez, la importancia de la dimerización para la actividad hidrolítica de LytA, confirmada posteriormente en varios mutantes de LytA (Romero *et al.*, 2007).

La disparidad que muestran Skl y LytA tanto en la afinidad por colina como en las condiciones de dimerización podría explicar el hecho de que la actividad específica de Skl sobre paredes purificadas de neumococo sea aproximadamente 100 veces menor a la de LytA, y que sea incapaz de matar a neumococo en condiciones en las que LytA (1 µg/ml) reduce

entre una y dos unidades logarítmicas la viabilidad de distintas cepas de este patógeno (**Figura 4.1.21**).

Estudiar el origen de estas diferencias y su relación con la actividad antibacteriana fue uno de los motivos que condujeron a la construcción de las quimeras QLAS1 y QSLA2, así como la posibilidad de crear nuevas lisinas activas. De acuerdo con la hipótesis de partida, la incorporación del CBM de LytA a la quimera QSLA2, aumentó la afinidad por colina y la capacidad de dimerización con respecto a Skl, aproximándolas al comportamiento mostrado por LytA, y lo contrario ocurre con la quimera QLAS1, cuya afinidad por colina y capacidad de dimerización disminuyen con respecto a LytA, sin llegar a los valores mostrados por Skl. Por otro lado, la comparación de los perfiles de DSC o de los espectros de DC de las quimeras con los de las enzimas parentales evidencia que los módulos integrados en las quimeras conservan las características que mostraban en las enzimas parentales.

Debido a la mayor cooperatividad de la unión de colina por el CBM de QLAS1, y a pesar de las diferencias de afinidad, la saturación de ambas quimeras se alcanza a concentraciones similares de colina, que son, sin embargo, algo superiores a las requeridas para la saturación de LytA (**Figura 4.2.3**). Este hecho podría explicar tanto que la actividad específica de QLAS1 y QSLA2 sobre paredes de neumococo purificadas sea muy parecida (**Tabla 4.2.6**), como las diferencias con la actividad específica de Skl y LytA. No así la actividad lítica sobre bacterias.

El hecho de que las quimeras tengan actividades relativas muy parecidas cuando actúan sobre paredes purificadas, en las que fragmentación del sustrato facilita la accesibilidad e hidrólisis de los enlaces susceptibles, y muy diferentes cuando lo hacen sobre bacterias pone de manifiesto la importancia que tiene la estructura de la envuelta bacteriana para la actividad exógena de las lisinas. Así, QSLA2 supera en 2-3 órdenes de magnitud la letalidad de LytA frente a neumococo, incluidas las cepas multi-resistentes 48 (23F) y 69 (19F), mientras que QLAS1 y Skl son inactivas a concentraciones comparables de enzima (1 $\mu\text{g/ml}$). Dado que QSLA2 y LytA comparten el 96,5% de sus CBMs, y que la mayor carga neta negativa de QSLA2 (-16,7 *vs* -12,6 en LytA a pH neutro) debe aumentar las interacciones electrostáticas desfavorables con la envuelta de la bacteria, estos resultados revelan que el dominio CHAP de Skl es más activo frente a las especies y cepas ensayadas que el dominio Amidasa_2 de LytA. No se puede descartar, sin embargo, una cierta influencia del

linker, ya que la quimera Cpl-711, formada por el módulo catalítico de Cpl-7 y el linker y el CBM de Cpl-1, es más letal frente a neumococo y otras bacterias portadoras de colina que la quimera Cpl-771, idéntica a la anterior excepto por el linker, que es el de Cpl-7 (Díez-Martínez *et al.*, 2015). Por otro lado, la falta de actividad de QSLA1 en las condiciones ensayadas demuestra que la baja letalidad de Skl es debida a su CBM, compartido por ambas.

Al igual que en QSLA2, la fusión del módulo catalítico de una lisina con menor actividad bactericida con el módulo de unión a la pared celular de otra más letal ha dado lugar a dos quimeras: PL3 (Blázquez *et al.*, 2016) y Cpl-711 (Díez-Martínez *et al.*, 2015) que son, junto a QSLA2, las lisinas con mayor actividad antineumocócica hasta ahora descritas. Este tipo de combinación entre módulos podría ser, por tanto, un método de carácter general para diseñar lisinas quiméricas más letales que las enzimas parentales. La selección evolutiva de módulos de unión a la pared bacteriana muy eficientes combinados con módulos catalíticos moderadamente eficientes, y viceversa, podría suponer un mecanismo para modular la actividad de estas enzimas, requeridas tanto por las bacterias a lo largo de su ciclo celular, como por los bacteriófagos para liberar la progenie en el momento óptimo de concentración de viriones.

In vivo, la capacidad de QSLA2 para proteger a embriones de pez cebra frente a la infección causada por la cepa D39 de *S. pneumoniae* es comparable a la mostrada por la quimera PL3 (Blázquez *et al.*, 2016). En ambos casos, con una única dosis de 15 µg la supervivencia de los embriones alcanza el 90% y con 20 µg el 100%, frente al 40% para los embriones no tratados con enzima. La eficacia de QSLA2 es, sin embargo, ligeramente superior a las de las endolisinas Cpl-1 o Cpl-7S, para las que el 100% de protección se alcanza a 25 µg de enzima (Díez-Martínez *et al.*, 2013). Asimismo, el valor de la CMI (0,5 µg/ml) de QSLA2 frente a la cepa tipo de neumococo utilizada en ensayos de susceptibilidad es inferior en un orden de magnitud al de LytA (4 µg/ml) y al de Cpl-1, que con una CMI de 16 µg/ml (Díez-Martínez *et al.*, 2013) es capaz de eliminar a *S. pneumoniae* del tracto respiratorio en ratones (Doehn *et al.*, 2013) y reducir drásticamente, por inhalación, la carga bacteriana y la bacteriemia en ratones afectados por una neumonía fatal (Doehn *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran, pues, que QSLA2 podría ser un buen candidato para combatir de forma altamente eficaz y a dosis bajas las infecciones

causadas por neumococo, incluidas las originadas por cepas multiresistentes a los antibióticos.

CONCLUSIONES

6

CONCLUSIONES

1. Skl es una proteína monomérica que dimeriza en presencia de colina. La dimerización requiere la saturación de los dos tipos de sitios de unión que tiene su CBM.
2. Se han modelado, por homología, las estructuras a alta resolución del módulo catalítico (N-Skl) y el CBM (C-Skl). La organización de los dominios dentro del monómero y el dímero se ha establecido a partir de los espectros de SAXS, mediante modelado de cuerpo rígido. La dimerización ocurriría, como en la autolisina LytA de neumococo, a través del extremo C-terminal de los monómeros, con los dominios catalíticos situados en trans.
3. El modelo de N-Skl ha permitido identificar y confirmar, por mutagénesis, los residuos catalíticos (Cys31 e His92) y sugerir como estabilizador de la carga durante la catálisis a un tercer residuo (Glu109), implicado también en la estabilidad estructural. En el CBM se han identificado cinco posibles sitios de unión a colina canónicos (*sitios 2-6*) y un sitio no canónico (*sitio 1*) situado en la interfaz de la primera repetición y el linker, con participación de residuos de la segunda repetición.

CONCLUSIONES

4. La construcción de quimeras mediante el intercambio de los dominios catalíticos y los CBMs de Skl y LytA ha permitido crear una lisina quimérica, QSLA2, más estable y con una actividad antineumocócica mayor que las de las enzimas parentales. Hemos demostrado, asimismo, la transmisión de información estructural a lo largo del CBM, capaz de modificar tanto la afinidad por colina como la cooperatividad de la unión.
5. La caracterización sistemática de Skl en comparación con la autolisina LytA y las quimeras QLAS1 y QSLA2 ha permitido demostrar que la afinidad por colina y la dimerización mediada por su unión son esenciales para la actividad antineumocócica de lisinas con CBMs similares al de LytA. Su modificación puede utilizarse como herramienta para mejorar o modular la actividad bacteriolítica.
6. Las diferencias encontradas en la eficiencia como antibacterianos de LytA y QSLA2 muestran también que el dominio CHAP de Skl es catalíticamente más eficaz que el de dominio Amidasa_2 de LytA.
7. Basándonos en nuestros resultados y otros datos de la bibliografía, proponemos que la combinación del dominio catalítico procedente de una lisina medianamente eficaz como antibacteriano sobre su hospedador, con el dominio de unión a la pared celular de otra más eficaz puede ser un mecanismo de carácter general para la construcción de enzibióticos con actividades mejoradas.
8. La quimera QSLA2 ha demostrado su capacidad enzibiótica *in vitro* frente a cepas patógenas y multi-resistentes de neumococo, así como *in vivo* en un modelo animal de infección en embriones de pez cebra, resultando ser una de las enzimas con actividad antineumocócica más eficaces descritas hasta la fecha.

BIBLIOGRAFÍA

7

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G., and Kutter, E.M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1, 66–85. **(Citado en página 37)**
- Abraham, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., and Florey, H.W. (1941). Further observations on penicillin (Originally published as Volume 2, Issue 6155). *The Lancet* 238, 177–189. **(Citado en página 12)**
- Ainavarapu, S.R.K., Brujić, J., Huang, H.H., Wiita, A.P., Lu, H., Li, L., Walther, K.A., Carrion-Vazquez, M., Li, H., and Fernandez, J.M. (2007). Contour Length and Refolding Rate of a Small Protein Controlled by Engineered Disulfide Bonds. *Biophys J* 92, 225–233. **(Citado en página 200)**
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., and Troitsky, N. (1998). Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J. Infect.* 36, 5–15. **(Citado en página 38)**
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389–3402. **(Citado en página 79)**

- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2003). Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biol* 4, R11. **(Citado en página 187)**
- Andreu, J.M., Bordas, J., Diaz, J.F., García de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E., and Towns-Andrews, E. (1992). Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol and MAP-induced microtubules. *J. Mol. Biol.* 226, 169–184. **(Citado en página 77)**
- Appelbaum, P.C. (1992). Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* 15, 77–83. **(Citado en página 12)**
- Appelbaum, P.C. (2002). Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Drug Selection. *Clin Infect Dis.* 34, 1613–1620. **(Citado en página 13)**
- Appelbaum, P.C., Bhamjee, A., Scragg, J.N., Hallett, A.F., Bowen, A.J., and Cooper, R.C. (1977). *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* 2, 995–997. **(Citado en página 12)**
- Aramini, J.M., Rossi, P., Huang, Y.J., Zhao, L., Jiang, M., Maglaqui, M., Xiao, R., Locke, J., Nair, R., Rost, B., *et al.* (2008). Solution NMR Structure of the NlpC/P60 Domain of Lipoprotein Spr from *Escherichia coli*: Structural Evidence for a Novel Cysteine Peptidase Catalytic Triad. *Biochemistry* 47, 9715–9717. **(Citado en páginas 104 y 106)**
- Arbique, J.C., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Quesne, G., Carvalho, M. da G.S., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Jackson, D., Davidson, R.J., and Facklam, R.R. (2004). Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4686–4696. **(Citado en página 4)**
- ASTM E729 - 96(2014) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. **(Citado en página 83)**
- Austrian, R. (1986). Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 Suppl A, 35–45. **(Citado en página 8)**
- Avery, O.T., and Cullen, G.E. (1923). Studies on the Enzymes of Pneumococcus Iv. Bacteriolytic Enzyme. *J Exp Med* 38, 199–206. **(Citado en página 7)**
- Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79, 137–158. **(Citado en página 6)**

B

- Bai, X.-H., Chen, H.-J., Jiang, Y.-L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., Li, Q., Qi, L., Zhang, J.-R., Chen, Y., *et al.* (2014). Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 289, 23403–23416. **(Citado en páginas 28 y 30)**
- Balsalobre, L., Hernández-Madrid, A., Llull, D., Martín-Galiano, A.J., García, E., Fenoll, A., and de la Campa, A.G. (2006). Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4163–4171. **(Citado en página 7)**
- Banks, D.J., Beres, S.B., and Musser, J.M. (2002). The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. *Trends Microbiol.* 10, 515–521. **(Citado en página 17)**
- Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (1996). Families and clans of cysteine peptidases. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 6, 1–11. **(Citado en páginas 35 y 106)**
- Bartual, S.G., Straume, D., Stamsås, G.A., Muñoz, I.G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L.S., and Hermoso, J.A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun* 5, 3842. **(Citado en páginas 35, 36, 188, 191 y 192)**
- Bateman, A., and Rawlings, N.D. (2003). The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem. Sci.* 28, 234–237. **(Citado en página 35)**
- Becker, S.C., Swift, S., Korobova, O., Schischkova, N., Kopylov, P., Donovan, D.M., and Abaev, I. (2015). Lytic activity of the staphylytic Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain. *FEMS Microbiol Lett* 362, 1–8. **(Citado en página 190)**
- Bensing, B.A., Siboo, I.R., and Sullam, P.M. (2001). Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. *Infect. Immun.* 69, 6186–6192. **(Citado en páginas 18 y 19)**
- Bergström, N., Jansson, P.-E., Kilian, M., and Skov Sørensen, U.B. (2000). Structures of two cell wall-associated polysaccharides of a *Streptococcus mitis* biovar 1 strain. *European Journal of Biochemistry* 267, 7147–7157. **(Citado en páginas 23, 25 y 128)**
- Bernstein, D., and Fischetti, V.A. (1997). Method for exposing group a streptococcal antigens and an improved diagnostic test for the identification of group a streptococci. **(Citado en página 38)**

- Bertani, G. (1951). STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*1. *Journal of Bacteriology* 62, 293. **(Citado en página 51)**
- Beveridge, T.J. (1981). Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int. Rev. Cytol.* 72, 229–317. **(Citado en página 25)**
- Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R., and Merrill, C.R. (2002). Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic from a Clinical Isolate of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70, 204–210. **(Citado en página 20)**
- Biziulevicius, G.A., Biziuleviciene, G., and Kazlauskaitė, J. (2008). A list of enzyme preparations covered by the term enzybiotics should not be restricted to bacteriophage-encoded peptidoglycan hydrolases (lysins). *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 531–532. **(Citado en página 38)**
- Blázquez, B., Fresco-Taboada, A., Iglesias-Bexiga, M., Menéndez, M., and García, P. (2016). PL3 Amidase, a Tailor-made Lysin Constructed by Domain Shuffling with Potent Killing Activity against Pneumococci and Related Species. *Front Microbiol* 7. **(Citado en páginas 30, 41, 126, 186, 196, 203 y 204)**
- Bogaert, D., De Groot, R., and Hermans, P.W.M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4, 144–154. **(Citado en página 7)**
- Borysowski, J., and Górski, A. (2009). Enzybiotics and their Potential Applications in Medicine. In *Enzybiotics*, T.G. Villa, and P. Veiga-Crespo, eds. (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 1–26. **(Citado en página 38)**
- Bowie, J.U., Lüthy, R., and Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164–170. **(Citado en página 80)**
- Brahms, S., and Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Journal of Molecular Biology* 138, 149–178. **(Citado en páginas 67 y 68)**
- Brandts, J.F., Hu, C.Q., Lin, L.N., and Mos, M.T. (1989). A simple model for proteins with interacting domains. Applications to scanning calorimetry data. *Biochemistry* 28, 8588–8596. **(Citado en página 198)**
- Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C.W., Hertveldt, K., and Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Mol. Microbiol.* 65, 1334–1344. **(Citado en página 40)**
- Briers, Y., Walmagh, M., and Lavigne, R. (2011). Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 110, 778–785. **(Citado en página 40)**

- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J.-P., *et al.* (2014). Engineered Endolysin-Based “Artilylins” To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *mBio* 5. **(Citado en página 39)**
- Brouwer, M.C., de Gans, J., Heckenberg, S.G.B., Zwinderman, A.H., van der Poll, T., and van de Beek, D. (2009). Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9, 31–44. **(Citado en página 8)**
- Brueggemann, A.B., Griffiths, D.T., Meats, E., Peto, T., Crook, D.W., and Spratt, B.G. (2003). Clonal Relationships between Invasive and Carriage *Streptococcus pneumoniae* and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potential. *J Infect Dis.* 187, 1424–1432. **(Citado en página 8)**
- Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W., and Beall, B. (2007). Vaccine Escape Recombinants Emerge after Pneumococcal Vaccination in the United States. *PLoS Pathog* 3. **(Citado en páginas 12 y 16)**
- Brussow, H. (2005). Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology* 151, 2133–2140. **(Citado en página 38)**
- Brzin, B. (1969). Reversion of alpha- into beta-hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia* 25, 985–986. **(Citado en página 6)**
- Buey, R.M., Monterroso, B., Menéndez, M., Diakun, G., Chacón, P., Hermoso, J.A., and Díaz, J.F. (2007). Insights into Molecular Plasticity of Choline Binding Proteins (Pneumococcal Surface Proteins) by SAXS. *Journal of Molecular Biology* 365, 411–424. **(Citado en páginas 34, 94, 115, 122 y 124)**
- Bui, N.K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., Simorre, J.-P., and Vollmer, W. (2012). Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal. Biochem.* 421, 657–666. **(Citado en página 22)**
- Bustamante, N., Rico-Lastres, P., García, E., García, P., and Menéndez, M. (2012). Thermal stability of Cpl-7 endolysin from the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-7; cell wall-targeting of its CW_7 motifs. *PLoS ONE* 7, e46654. **(Citado en página 41)**

C

- de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., and Muñoz, R. (1997). Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. *Microb. Drug Resist.* 3, 177–193. **(Citado en página 7)**
- Cardaci, A., Papasergi, S., Midiri, A., Mancuso, G., Domina, M., Cariccio, V.L., Mandanici, F., Galbo, R., Passo, C.L., Pernice, I., *et al.* (2012). Protective Activity of *Streptococcus pneumoniae* Spr1875 Protein Fragments Identified Using a Phage Displayed Genomic Library. *PLoS ONE* 7, e36588. **(Citado en página 12)**
- Catto, B.A., Jacobs, M.R., and Shlaes, D.M. (1987). *Streptococcus mitis*. A cause of serious infection in adults. *Arch. Intern. Med.* 147, 885–888. **(Citado en página 16)**
- CDC (2015). Pneumococcal Disease | Drug Resistance | Antibiotic Resistance | CDC. <https://www.cdc.gov/pneumococcal/drug-resistance.html> **(Citado en página 3)**
- CDC (2016). CDC | Pneumococcal Vaccination | What You Should Know. <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/public/> **(Citado en página 11)**
- Cerdá Zolezzi, P., Laplana, L.M., Calvo, C.R., Cepero, P.G., Erazo, M.C., and Gómez-Lus, R. (2004). Molecular basis of resistance to macrolides and other antibiotics in commensal viridans group streptococci and *Gemella* spp. and transfer of resistance genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3462–3467. **(Citado en página 16)**
- Chacon, P., Moran, F., Diaz, J.F., Pantos, E., and Andreu, J.M. (1998). Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. *Biophysical Journal* 74, 2760–2775. **(Citado en página 76)**
- Chacón, P., Díaz, J.F., Morán, F., and Andreu, J.M. (2000). Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. *Journal of Molecular Biology* 299, 1289–1302. **(Citado en página 76)**
- Chanishvili, N. (2012). Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv. Virus Res.* 83, 3–40. **(Citado en página 37)**
- Claverys, J.P., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., and Martin, B. (2000). Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol. Microbiol.* 35, 251–259. **(Citado en página 6)**

- CLSI. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.7. **(Citado en página 83)**
- Clutterbuck, E.A., Lazarus, R., Yu, L.-M., Bowman, J., Bateman, E.A.L., Diggle, L., Angus, B., Peto, T.E., Beverley, P.C., Mant, D., *et al.* (2012). Pneumococcal conjugate and plain polysaccharide vaccines have divergent effects on antigen-specific B cells. *J. Infect. Dis.* 205, 1408–1416. **(Citado en página 11)**
- Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M., Zhou, J., Martin, C., Spratt, B.G., and Musser, J.M. (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 5, 2255–2260. **(Citado en página 13)**
- Cole, R. (1914). Pneumococcus infection and lobar pneumonia. *Arch Intern Med (Chic)* XIV, 56–93. **(Citado en página 6)**
- Cole, J.L., Lary, J.W., Moody, T., and Laue, T.M. (2008). Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. *Methods Cell Biol* 84, 143–179. **(Citado en página 72)**
- Crisóstomo, M.I., Vollmer, W., Kharat, A.S., Inhülsen, S., Gehre, F., Buckenmaier, S., and Tomasz, A. (2006). Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 61, 1497–1509. **(Citado en página 22)**
- Cuff, J.A., and Barton, G.J. (2000). Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins* 40, 502–511. **(Citado en página 80)**
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkilä, I., and Tuomane, E.I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377, 435–438. **(Citado en página 25)**
- Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V.A., Foster, S., Gilmore, B.F., Hancock, R.E.W., Harper, D., *et al.* (2016). Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* 16, 239–251. **(Citado en página 20)**

D

- Dagan, R., Givon-Lavi, N., Greenberg, D., Fritzell, B., and Siegrist, C.-A. (2010). Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* shortly before vaccination with a pneumococcal conjugate vaccine causes serotype-specific hyporesponsiveness in early infancy. *J. Infect. Dis.* 201, 1570–1579. **(Citado en página 11)**
- De Las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* 184, 4988–5000. **(Citado en página 25)**
- De Lencastre, H., and Tomasz, A. (2002). From ecological reservoir to disease: the nasopharynx, day-care centres and drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50 Suppl S2, 75–81. **(Citado en página 8)**
- Del Cerro, C., Felpeto-Santero, C., Rojas, A., Tortajada, M., Ramón, D., and García, J.L. (2013). Genome Sequence of the Butanol Hyperproducer *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Genome Announc* 1, e0007013. **(Citado en página 26)**
- Demarest, S.J., Salbato, J., Elia, M., Zhong, J., Morrow, T., Holland, T., Kline, K., Woodnutt, G., Kimmel, B.E., and Hansen, G. (2005). Structural characterization of the cell wall binding domains of *Clostridium difficile* toxins A and B; evidence that Ca^{2+} plays a role in toxin A cell surface association. *J. Mol. Biol.* 346, 1197–1206. **(Citado en página 26)**
- Denapaite, D., Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Henrich, B., Maurer, P., Schähle, Y., Selbmann, P., Zimmermann, W., Wambutt, R., *et al.* (2010). The Genome of *Streptococcus mitis* B6 - What Is a Commensal? *PLoS ONE* 5, e9426. **(Citado en páginas 14, 26 y 53)**
- Denapaite, D., Brückner, R., Hakenbeck, R., and Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of Teichoic Acids in *Streptococcus pneumoniae* and Closely Related Species: Lessons from Genomes. *Microbial Drug Resistance* 18, 344–358. **(Citado en página 23)**
- D'Hérelle (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci Ser D.* 165, 373–375. **(Citado en página 17)**
- D'Herelle, F. (1931). Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. *Bull N Y Acad Med* 7, 329–348. **(Citado en página 37)**
- Díaz, E., López, R., and García, J.L. (1990). Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8125–8129. **(Citado en página 30)**

- Díaz, E., López, R., and García, J.L. (1991). Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.* 266, 5464–5471. **(Citado en página 30)**
- Díaz, E., López, R., and García, J.L. (1992). EJ-1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a Myoviridae morphotype. *J. Bacteriol.* 174, 5516–5525. **(Citado en página 34)**
- Díaz, E., Munthali, M., Lunsdorf, H., Holtje, J.V., and Timmis, K.N. (1996). The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in gram-negative bacteria: triggering of the major pneumococcal autolysin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19, 667–681. **(Citado en página 20)**
- Díez-Martínez, R., de Paz, H., Bustamante, N., García, E., Menéndez, M., and García, P. (2013). Improving the lethal effect of Cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5355–5365. **(Citado en páginas 39, 40, 41, 83, 126, 131, 132 y 204)**
- Díez-Martínez, R., Paz, H.D.D., García-Fernández, E., Bustamante, N., Euler, C.W., Fischetti, V.A., Menendez, M., and García, P. (2015). A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1763–1773. **(Citado en páginas 30, 39, 41, 126, 131, 154, 186 y 203)**
- Djurkovic, S., Loeffler, J.M., and Fischetti, V.A. (2005). Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1225–1228. **(Citado en página 40)**
- Dmitriev, B., Toukach, F., and Ehlers, S. (2005). Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends Microbiol.* 13, 569–574. **(Citado en página 22)**
- Doehn, J.M., Reppe, K., Gutbier, B., Tschernig, T., Hocke, A., Fischetti, V.A., Suttorp, N., Hippenstiel, S., and Witzenrath, M. (2011). Inhalative use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Pneumologie* 65, A20. **(Citado en página 204)**
- Doehn, J.M., Fischer, K., Reppe, K., Gutbier, B., Tschernig, T., Hocke, A.C., Fischetti, V.A., Löffler, J., Suttorp, N., Hippenstiel, S., *et al.* (2013). Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2111–2117. **(Citado en páginas 39 y 204)**
- Doern, G.V., Ferraro, M.J., Brueggemann, A.B., and Ruoff, K.L. (1996). Emergence of high rates of antimicrobial resistance among viridans group streptococci in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 891–894. **(Citado en página 16)**

BIBLIOGRAFÍA

- Domenech, M., García, E., and Moscoso, M. (2009). Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Environmental Microbiology* 11, 2542–2555. **(Citado en página 52)**
- Domenech, M., García, E., and Moscoso, M. (2011). In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4144–4148. **(Citado en página 40)**
- Donati, C., Hiller, N.L., Tettelin, H., Muzzi, A., Croucher, N.J., Angiuoli, S.V., Oggioni, M., Dunning Hotopp, J.C., Hu, F.Z., Riley, D.R., *et al.* (2010). Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. *Genome Biol.* 11, R107. **(Citado en páginas 4 y 6)**
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127–6145. **(Citado en página 57)**
- Draing, C., Pfitzenmaier, M., Zummo, S., Mancuso, G., Geyer, A., Hartung, T., and von Aulock, S. (2006). Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 281, 33849–33859. **(Citado en página 25)**
- Drijkoningen, J.J.C., and Rohde, G.G.U. (2014). Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clinical Microbiology and Infection* 20, Supplement 5, 45–51. **(Citado en página 8)**

E

- Eberhardt, A., Hoyland, C.N., Vollmer, D., Bisle, S., Cleverley, R.M., Johnsborg, O., Håvarstein, L.S., Lewis, R.J., and Vollmer, W. (2012). Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 18, 240–255. **(Citado en página 9)**
- Eisenberg, D., Lüthy, R., and Bowie, J.U. (1997). VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Meth. Enzymol.* 277, 396–404. **(Citado en página 80)**
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H.S., Berg, K.H., Hermoso, J.A., and Håvarstein, L.S. (2010). Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Mol. Microbiol.* 76, 905–917. **(Citado en página 28)**

- Elting, L.S., Bodey, G.P., and Keefe, B.H. (1992). Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. *Clin. Infect. Dis.* 14, 1201–1207. **(Citado en página 16)**
- Entenza, J.M., Loeffler, J.M., Grandgirard, D., Fischetti, V.A., and Moreillon, P. (2005). Therapeutic Effects of Bacteriophage Cpl-1 Lysin against *Streptococcus pneumoniae* Endocarditis in Rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4789–4792. **(Citado en página 39)**

F

- Farkasovská, J., Godány, A., and Vlcek, C. (2003). Identification and characterization of an endolysin encoded by the *Streptomyces aureofaciens* phage mu 1/6. *Folia Microbiol. (Praha)* 48, 737–744. **(Citado en páginas 39 y 40)**
- Feldman, C., and Anderson, R. (2014). Review: Current and new generation pneumococcal vaccines. *Journal of Infection* 69, 309–325. **(Citado en página 12)**
- Fenoll, A., Martinez-Suarez, J.V., Muñoz, R., Casal, J., and Garcia, J.L. (1990). Identification of atypical strains of *Streptococcus pneumoniae* by a specific DNA probe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 396–401. **(Citado en página 7)**
- Fenton, M., Casey, P.G., Hill, C., Gahan, C.G., Ross, R.P., McAuliffe, O., O'Mahony, J., Maher, F., and Coffey, A. (2010). The truncated phage lysin CHAP(k) eliminates *Staphylococcus aureus* in the nares of mice. *Bioeng Bugs* 1, 404–407. **(Citado en página 40)**
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2001). A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Mol Biol* 8, 1020–1024. **(Citado en páginas 31, 32, 89, 90, 94, 114, 122, 122 y 200)**
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G., and Romero, A. (2002). Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.* 321, 163–173. **(Citado en páginas 32, 115, 116, 200 y 202)**
- Filatova, L.Y., Becker, S.C., Donovan, D.M., Gladilin, A.K., and Klyachko, N.L. (2010). LysK, the enzyme lysing *Staphylococcus aureus* cells: Specific kinetic features and approaches towards stabilization. *Biochimie* 92, 507–513. **(Citado en página 190)**

BIBLIOGRAFÍA

- Fischer, W. (2000). Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Research in Microbiology* 151, 421–427. **(Citado en página 22)**
- Fischer, H., and Tomasz, A. (1985). Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 163, 46–54. **(Citado en página 22)**
- Fischer, W., Behr, T., Hartmann, R., Peter-Katalinić, J., and Egge, H. (1993). Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide). *Eur. J. Biochem.* 215, 851–857. **(Citado en página 25)**
- Fischetti, V.A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* 13, 491–496. **(Citado en página 20)**
- Fischetti, V.A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 393–400. **(Citado en página 38)**
- Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2010). Host-guest chemistry of the peptidoglycan. *J. Med. Chem.* 53, 4813–4829. **(Citado en páginas 21 y 22)**
- Fortier, L.-C., and Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4, 354–365. **(Citado en página 18)**
- Franke, D., and Svergun, D.I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* 42, 342–346. **(Citado en páginas 76 y 78)**
- Freskgård, P.O., Mårtensson, L.G., Jonasson, P., Jonsson, B.H., and Carlsson, U. (1994). Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular dichroism spectrum of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry* 33, 14281–14288. **(Citado en página 68)**

G

- García, E., Ronda, C., García, J., and López, R. (1985). A rapid procedure to detect the autolysin phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 29, 77–81. **(Citado en página 7)**
- García, E., García, J.L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J.M., and López, R. (1988). Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 914–918. **(Citado en página 30)**
- García, J.L., García, E., and López, R. (1987). Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* 149, 52–56. **(Citado en página 54)**

- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J., and López, R. (2000). Versatility of choline-binding domain. In *Streptococcus Pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease., A. Tomasz, ed. (Larchmont, NY: Mary Ann Liebert), pp. 231–244. **(Citado en página 26)**
- García, P., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M., and López, R. (1990). Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene* 86, 81–88. **(Citado en página 30)**
- García, P., Martín, A.C., and López, R. (1997). Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. *Microb. Drug Resist.* 3, 165–176. **(Citado en página 20)**
- García, P., García, J., López, R.L., and García, E. (2005). Pneumococcal Phages. In Phages, W.M. (ed) Friedman D, Adhya S., ed. (ASM Press, Washington, DC), pp. 335–361. **(Citado en páginas 17 y 18)**
- García de la Torre, J., del Rio Echenique, G., and Ortega, A. (2007). Improved Calculation of Rotational Diffusion and Intrinsic Viscosity of Bead Models for Macromolecules and Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 111, 955–961. **(Citado en página 79)**
- García-Bustos, J., and Tomasz, A. (1990). A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5415–5419. **(Citado en página 21)**
- García-Bustos, J.F., Chait, B.T., and Tomasz, A. (1987). Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 262, 15400–15405. **(Citado en página 21)**
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, ed. (Humana Press), pp. 571–607. **(Citado en página 65)**
- Geno, K.A., Gilbert, G.L., Song, J.Y., Skovsted, I.C., Klugman, K.P., Jones, C., Konradsen, H.B., and Nahm, M.H. (2015). Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 871–899. **(Citado en página 10)**
- Gerstmans, H., Rodríguez-Rubio, L., Lavigne, R., and Briers, Y. (2016). From endolysins to Artilyns[®]: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochemical Society Transactions* 44, 123–128. **(Citado en página 39)**
- Gilmer, D.B., Schmitz, J.E., Euler, C.W., and Fischetti, V.A. (2013). Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by *Streptococcus pyogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2743–2750. **(Citado en página 186)**

BIBLIOGRAFÍA

- Gisch, N., Kohler, T., Ulmer, A.J., Muthing, J., Pribyl, T., Fischer, K., Lindner, B., Hammerschmidt, S., and Zähringer, U. (2013). Structural Reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* Lipoteichoic Acid and New Insights into Its Immunostimulatory Potency. *J Biol Chem* 288, 15654–15667. **(Citado en páginas 23 y 24)**
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (2000). Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68, 5690–5695. **(Citado en página 26)**
- Gram, H.C. (1884). Ueber die isolirte färbung der schizomycetes in schnitt- und trockenpräparaten. *Fortschr. Med.* 2, 185–189. **(Citado en página 5)**
- Greene, N.G., Narciso, A.R., Filipe, S.R., and Camilli, A. (2015). Peptidoglycan Branched Stem Peptides Contribute to *Streptococcus pneumoniae* Virulence by Inhibiting Pneumolysin Release. *PLoS Pathog.* 11, e1004996. **(Citado en página 20)**
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27, 113–159. **(Citado en página 5)**
- Grishina, I.B., and Woody, R.W. (1994). Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss.* 245–262. **(Citado en página 68)**
- Gu, J., Xu, W., Lei, L., Huang, J., Feng, X., Sun, C., Du, C., Zuo, J., Li, Y., Du, T., *et al.* (2011). LysGH15, a Novel Bacteriophage Lysin, Protects a Murine Bacteremia Model Efficiently against Lethal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *J. Clin. Microbiol.* 49, 111–117. **(Citado en página 38)**
- Gu, J., Feng, Y., Feng, X., Sun, C., Lei, L., Ding, W., Niu, F., Jiao, L., Yang, M., Li, Y., *et al.* (2014). Structural and Biochemical Characterization Reveals LysGH15 as an Unprecedented “EF-Hand-Like” Calcium-Binding Phage Lysin. *PLOS Pathog* 10, e1004109. **(Citado en páginas 35, 36, 188, 190, 191 y 192)**

H

- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D., and Brückner, R. (2009). Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 572–586. **(Citado en página 26)**

- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Müller, E., and Rohde, M. (2005). Illustration of Pneumococcal Polysaccharide Capsule during Adherence and Invasion of Epithelial Cells. *Infect Immun* 73, 4653–4667. **(Citado en página 9)**
- Hankin, M.E. (1896). L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du choléra. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 10, 511–523. **(Citado en página 16)**
- Hanlon, G.W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 118–128. **(Citado en página 37)**
- Hannan, S., Ready, D., Jasni, A.S., Rogers, M., Pratten, J., and Roberts, A.P. (2010). Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 345–349. **(Citado en página 5)**
- Hansen, J.C., Lebowitz, J., and Demeler, B. (1994). Analytical ultracentrifugation of complex macromolecular systems. *Biochemistry* 33, 13155–13163. **(Citado en página 73)**
- Hansman, D., and Bullen, M.M. (1967). A resistant pneumococcus. *The Lancet* 290, 264–265. **(Citado en página 12)**
- Hardie, J.M., and Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 26, 1S–11S. **(Citado en página 4)**
- Håvarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1999). Quorum sensing and peptide pheromones in streptococcal competence for genetic transformation. In *Cell-Cell Signaling in Bacteria.*, G.M. Dunny, and Winans, eds. (Washington, D.C.: ASM Press), pp. 9–26. **(Citado en página 6)**
- Heidelberger, M. (1983). Precipitating cross-reactions among pneumococcal types. *Infect. Immun.* 41, 1234–1244. **(Citado en página 10)**
- Hergott, C.B., Roche, A.M., Naidu, N.A., Mesaros, C., Blair, I.A., and Weiser, J.N. (2015). Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *J. Clin. Invest.* 125, 3878–3890. **(Citado en páginas 25 y 27)**
- Hermoso, J.A., Monterroso, B., Albert, A., Galán, B., Ahrazem, O., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., and Menéndez, M. (2003). Structural Basis for Selective Recognition of Pneumococcal Cell Wall by Modular Endolysin from Phage Cp-1. *Structure* 11, 1239–1249. **(Citado en páginas 30, 31, 33, 34, 89, 93, 114, 122 y 200)**
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., and Menéndez, M. (2005). Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol* 12, 533–538. **(Citado en páginas 27, 30, 31, 33, 34, 89 y 122)**

BIBLIOGRAFÍA

- Hermoso, J.A., García, J.L., and García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 461–472. **(Citado en página 20)**
- Ho, J.G.S., Greco, A., Rupnik, M., and Ng, K.K.-S. (2005). Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18373–18378. **(Citado en página 26)**
- Höltje, J.V., and Tomasz, A. (1976). Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* 251, 4199–4207. **(Citado en páginas 7 y 81)**
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., *et al.* (2001). Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *J. Bacteriol.* 183, 5709–5717. **(Citado en página 52)**
- Husain, E., Whitehead, S., Castell, A., Thomas, E.E., and Speert, D.P. (2005). Viridans streptococci bacteremia in children with malignancy: relevance of species identification and penicillin susceptibility. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, 563–566. **(Citado en página 15)**

I

- Ip, M., Chau, S.S.L., Chi, F., Tang, J., and Chan, P.K. (2007). Fluoroquinolone resistance in atypical pneumococci and oral streptococci: evidence of horizontal gene transfer of fluoroquinolone resistance determinants from *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2690–2700. **(Citado en página 13)**

J

- Jacobs, M.R., Koornhof, H.J., Robins-Browne, R.M., Stevenson, C.M., Vermaak, Z.A., Freiman, I., Miller, G.B., Witcomb, M.A., Isaäcson, M., Ward, J.I., *et al.* (1978). Emergence of multiply resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.* 299, 735–740. **(Citado en página 12)**
- Jado, I., López, R., García, E., Fenoll, A., Casal, J., García, P., and Network, on behalf of the S.P.I.S. (2003). Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 967–973. **(Citado en página 40 y 126)**

- Jefferies, J., Nieminen, L., Kirkham, L.-A., Johnston, C., Smith, A., and Mitchell, T.J. (2007). Identification of a Secreted Cholesterol-Dependent Cytolysin (Mitilysin) from *Streptococcus mitis*. *J Bacteriol* 189, 627–632. **(Citado en página 14)**
- Jensen, A., Valdórrsson, O., Frimodt-Møller, N., Hollingshead, S., and Kilian, M. (2015). Commensal Streptococci Serve as a Reservoir for β -Lactam Resistance Genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3529–3540. **(Citado en página 5)**

K

- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Micro* 6, 288–301. **(Citado en página 10)**
- Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B., and Drenth, J. (1984). Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 179, 233–256. **(Citado en página 35)**
- Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 406–408. **(Citado en página 4)**
- Keefer CS, Blake FG, Marshall E, Jr., Lockwood JS, Wood W, and Jr. (1943). Penicillin in the treatment of infections: A report of 500 cases. *JAMA* 122, 1217–1224. **(Citado en página 12)**
- Keen, E.C. (2012). Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2. **(Citado en página 17)**
- Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1751, 119–139. **(Citado en página 66)**
- Kelly, T., Dillard, J.P., and Yother, J. (1994). Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 62, 1813–1819. **(Citado en página 10)**
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L.S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H., and Sørensen, U.B.S. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and Its Close Commensal Relatives. *PLoS ONE* 3, e2683. **(Citado en páginas 14 y 26)**
- Kilian, M., Riley, D.R., Jensen, A., Brüggemann, H., and Tettelin, H. (2014). Parallel Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* to Pathogenic and Mutualistic Lifestyles. *mBio* 5. **(Citado en página 5)**

BIBLIOGRAFÍA

- Kim, H.S., and Gabel, F. (2015). Uniqueness of models from small-angle scattering data: the impact of a hydration shell and complementary NMR restraints. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71, 57–66. **(Citado en página 118)**
- Kislak, J.W., Razavi, L.M., Daly, A.K., and Finland, M. (1965). Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am. J. Med. Sci.* 250, 261–268. **(Citado en página 12)**
- Klugman, K.P. (2002). The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 1–6. **(Citado en página 13)**
- Koch, M.H.J., Vachette, P., and Svergun, D.I. (2003). Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics* 36, 147–227. **(Citado en página 76)**
- König, A., Reinert, R.R., and Hakenbeck, R. (1998). *Streptococcus mitis* with Unusually High Level Resistance to β -Lactam Antibiotics. *Microbial Drug Resistance* 4, 45–49. **(Citado en página 53)**
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., and Brückner, R. (2006). A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 188, 5797–5805. **(Citado en página 25)**
- Kozin, M.B., and Svergun, D.I. (2001). Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography* 34, 33–41. **(Citado en páginas 78, 79 y 123)**
- Kuntz, I.D. (1971). Hydration of macromolecules. IV. Polypeptide conformation in frozen solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 516–518. **(Citado en página 94)**
- Kusuma, C., Jadanova, A., Chanturiya, T., and Kokai-Kun, J.F. (2007). Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 475–482. **(Citado en página 186)**

L

- Lacks, S.A. (1977). Binding and entry of DNA in bacterial transformation. In *Microbial Interactions*, J.L. Reissig, ed. (London: Chapman and Hall), pp. 179–232. **(Citado en página 6)**

- Lacks, S., and Hotchkiss, R.D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* 39, 508–518. **(Citado en página 51)**
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. **(Citado en página 65)**
- Lai, M.-J., Lin, N.-T., Hu, A., Soo, P.-C., Chen, L.-K., Chen, L.-H., and Chang, K.-C. (2011). Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ϕ AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 529–539. **(Citado en página 40)**
- Lanie, J.A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., Tettelin, H., Glass, J.I., and Winkler, M.E. (2007). Genome Sequence of Avery's Virulent Serotype 2 Strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory Strain R6. *J. Bacteriol.* 189, 38–51. **(Citado en página 52)**
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26, 283–291. **(Citado en página 80)**
- Laue T.M., Shah B.D., Ridgeway T.M., and Pelletier S.L (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, (Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom), pp. 90–125. **(Citado en página 74)**
- Layec, S., Decaris, B., and Leblond-Bourget, N. (2008). Characterization of proteins belonging to the CHAP-related superfamily within the Firmicutes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14, 31–40. **(Citado en página 192)**
- Lebon, A., Verkaik, N.J., Labout, J.A.M., de Vogel, C.P., Hooijkaas, H., Verbrugh, H.A., van Wamel, W.J.B., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Hermans, P.W.M., *et al.* (2011). Natural antibodies against several pneumococcal virulence proteins in children during the pre-pneumococcal-vaccine era: the generation R study. *Infect. Immun.* 79, 1680–1687. **(Citado en página 12)**
- Li, Q., Cheng, W., Morlot, C., Bai, X.-H., Jiang, Y.-L., Wang, W., Roper, D.I., Vernet, T., Dong, Y.-H., Chen, Y., *et al.* (2015). Full-length structure of the major autolysin LytA. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 71, 1373–1381. **(Citado en páginas 30, 31, 32, 93, 94, 115, 122, 197, 198, 199, 200 y 201)**
- Link-Gelles, R., Thomas, A., Lynfield, R., Petit, S., Schaffner, W., Harrison, L., Farley, M.M., Aragon, D., Nicols, M., Kirley, P.D., *et al.* (2013). Geographic and temporal trends in antimicrobial nonsusceptibility in *Streptococcus pneumoniae* in the post-vaccine era in the United States. *J. Infect. Dis.* 208, 1266–1273. **(Citado en página 16)**

BIBLIOGRAFÍA

- Llull, D., López, R., and García, E. (2006). Skl, a novel choline-binding N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain. *FEBS Letters* 580, 1959–1964. **(Citado en páginas 18, 27, 28, 35, 53, 54, 89, 126, 128, 188 y 190)**
- Loc-Carrillo, C., and Abedon, S.T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1, 111–114. **(Citado en página 38)**
- Loeffler, J.M., and Fischetti, V.A. (2003). Synergistic Lethal Effect of a Combination of Phage Lytic Enzymes with Different Activities on Penicillin-Sensitive and -Resistant *Streptococcus pneumoniae* Strains. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 375–377. **(Citado en página 40)**
- Loeffler, J.M., Nelson, D., and Fischetti, V.A. (2001). Rapid Killing of *Streptococcus pneumoniae* with a Bacteriophage Cell Wall Hydrolase. *Science* 294, 2170–2172. **(Citado en páginas 38, 40 y 185)**
- Loeffler, J.M., Djurkovic, S., and Fischetti, V.A. (2003). Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia. *Infect Immun* 71, 6199–6204. **(Citado en página 40)**
- Loessner, M.J., Kramer, K., Ebel, F., and Scherer, S. (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 44, 335–349. **(Citado en páginas 39 y 40)**
- Lood, R., Winer, B.Y., Pelzek, A.J., Diez-Martinez, R., Thandar, M., Euler, C.W., Schuch, R., and Fischetti, V.A. (2015). Novel Phage Lysin Capable of Killing the Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterium *Acinetobacter baumannii* in a Mouse Bacteremia Model. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 1983–1991. **(Citado en página 40)**
- López, R. (2004). *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. *International Microbiology* 7, 163–171. **(Citado en página 19)**
- López, R., and García, E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 553–580. **(Citado en páginas 8, 16, 27 y 39)**
- López, R., González, M.P., García, E., García, J.L., and García, P. (2000). Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Res. Microbiol.* 151, 437–443. **(Citado en página 30)**
- Lovering, A.L., Safadi, S.S., and Strynadka, N.C.J. (2012). Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annual Review of Biochemistry* 81, 451–478. **(Citado en página 20)**
- Low, L.Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A., and Liddington, R. (2011). Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins. *J. Biol. Chem.* 286, 34391–34403. **(Citado en páginas 39, 131 y 132)**

- Lu, H.-Z., Weng, X.-H., Zhu, B., Li, H., Yin, Y.-K., Zhang, Y.-X., Haas, D.W., and Tang, Y.-W. (2003). Major outbreak of toxic shock-like syndrome caused by *Streptococcus mitis*. J. Clin. Microbiol. 41, 3051–3055. **(Citado en página 15)**
- Lukacik, P., Barnard, T.J., Keller, P.W., Chaturvedi, K.S., Seddiki, N., Fairman, J.W., Noinaj, N., Kirby, T.L., Henderson, J.P., Steven, A.C., *et al.* (2012). Structural engineering of a phage lysin that targets gram-negative pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 9857–9862. **(Citado en página 40)**
- Lund, E., and Henrichsen, J. (1978). Chapter XI Laboratory Diagnosis, Serology and Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In Methods in Microbiology, T.B. and J.R. Norris, ed. (Academic Press), pp. 241–262. **(Citado en página 7)**
- Luque, I., Leavitt, Stephanie A. and Freire, E. (2002). The Linkage Between Protein Folding and Functional Cooperativity: Two Sides of the Same Coin? Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 31, 235–256. **(Citado en página 198)**
- Lüthy, R., Bowie, J.U., and Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature 356, 83–85. **(Citado en página 80)**
- Lyall, H.W., and Odell, H.R. (1939). Production and Standardization of Diagnostic Antipneumococcus Sera. Am. J. Epidemiol. 29–SectionB, 103–106. **(Citado en página 10)**

M

- Madhour, A., Maurer, P., and Hakenbeck, R. (2011). Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. Iran J Microbiol 3, 58–67. **(Citado en páginas 14 y 26)**
- Maeda, Y., Elborn, J.S., Parkins, M.D., Reihill, J., Goldsmith, C.E., Coulter, W.A., Mason, C., Millar, B.C., Dooley, J.S.G., Lowery, C.J., *et al.* (2011). Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) including *Streptococcus pneumoniae* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF). J. Cyst. Fibros. 10, 133–139. **(Citado en página 4)**
- Maestro, B., and Sanz, J.M. (2005). Accumulation of partly folded states in the equilibrium unfolding of the pneumococcal choline-binding module C-LytA. Biochem J 387, 479–488. **(Citado en página 116)**

BIBLIOGRAFÍA

- Martens, P., Worm, S.W., Lundgren, B., Konradsen, H.B., and Benfield, T. (2004). Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. BMC Infect. Dis. 4, 21. **(Citado en página 10)**
- Martin, S.R., and Schilstra, M.J. (2008). Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. Methods Cell Biol. 84, 263–293. **(Citado en página 67)**
- Martín, A.C., López, R., and García, P. (1998). Functional analysis of the two-gene lysis system of the pneumococcal phage Cp-1 in homologous and heterologous host cells. J. Bacteriol. 180, 210–217. **(Citado en página 20)**
- Martín-Galiano, A.J., Balsalobre, L., Fenoll, A., and de la Campa, A.G. (2003). Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3187–3194. **(Citado en página 7)**
- Matsui, N., Ito, M., Kuramae, H., Inukai, T., Sakai, A., and Okugawa, M. (2013). Infective endocarditis caused by multidrug-resistant *Streptococcus mitis* in a combined immunocompromised patient: an autopsy case report. J. Infect. Chemother. 19, 321–325. **(Citado en página 16)**
- McCarthy, M. (2013). CDC calls for urgent action to combat rise of drug resistant pathogens. The BMJ 347, f5649. **(Citado en página 13)**
- McCormick, A.W., Whitney, C.G., Farley, M.M., Lynfield, R., Harrison, L.H., Bennett, N.M., Schaffner, W., Reingold, A., Hadler, J., Cieslak, P., *et al.* (2003). Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Nat. Med. 9, 424–430. **(Citado en página 16)**
- McCullers, J.A., and Tuomanen, E.I. (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Front. Biosci. 6, D877-889. **(Citado en página 20)**
- McCullers, J.A., Karlström, A., Iverson, A.R., Loeffler, J.M., and Fischetti, V.A. (2007). Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. PLoS Pathog. 3, e28. **(Citado en página 38)**
- McGowan, S., Buckle, A.M., Mitchell, M.S., Hoopes, J.T., Gallagher, D.T., Heselpoth, R.D., Shen, Y., Reboul, C.F., Law, R.H.P., Fischetti, V.A., *et al.* (2012). X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysis PlyC. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 12752–12757. **(Citado en páginas 35, 36 y 192)**
- McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 16, 404–405. **(Citado en página 80)**

- Medrano, F.J., Gasset, M., López-Zúmel, C., Usobiaga, P., García, J.L., and Menéndez, M. (1996). Structural Characterization of the Unligated and Choline-bound Forms of the Major Pneumococcal Autolysin LytA Amidase CONFORMATIONAL TRANSITIONS INDUCED BY TEMPERATURE. *J. Biol. Chem.* 271, 29152–29161. **(Citado en páginas 89, 90, 92, 97, 135, 137, 194 y 200)**
- Melin, M., Trzciński, K., Meri, S., Käyhty, H., and Väkeväinen, M. (2010). The Capsular Serotype of *Streptococcus pneumoniae* Is More Important than the Genetic Background for Resistance to Complement. *Infect Immun* 78, 5262–5270. **(Citado en página 10)**
- Mellroth, P., Sandalova, T., Kikhney, A., Vilaplana, F., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Normark, S., Svergun, D., Henriques-Normark, B., *et al.* (2014). Structural and Functional Insights into Peptidoglycan Access for the Lytic Amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 5. **(Citado en páginas 31, 32, 93, 94, 111, 115, 122, 122, 124, 197, 199, 200 y 201)**
- Meroueh, S.O., Bencze, K.Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J.F., Stemmler, T.L., and Mobashery, S. (2006). Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4404–4409. **(Citado en página 22)**
- Millar, B.C., and Moore, J.E. (2004). Emerging Issues in Infective Endocarditis. *Emerg Infect Dis* 10, 1110–1116. **(Citado en página 15)**
- Mitchell, J. (2011). *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol* 26, 89–98. **(Citado en páginas 4, 14 y 15)**
- Mitchell, T.J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. *Nat Rev Micro* 1, 219–230. **(Citado en página 8)**
- Mitchell, A.M., and Mitchell, T.J. (2010). *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 411–418. **(Citado en página 8)**
- Mitchell, L.S., and Tuomanen, E.I. (2002). Molecular analysis of antibiotic tolerance in pneumococci. *International Journal of Medical Microbiology* 292, 75–79. **(Citado en página 13)**
- Mitchell, J., Siboo, I.R., Takamatsu, D., Chambers, H.F., and Sullam, P.M. (2007). Mechanism of cell surface expression of the *Streptococcus mitis* platelet binding proteins PblA and PblB. *Molecular Microbiology* 64, 844–857. **(Citado en página 15)**
- Mold, C., Rodgers, C.P., Kaplan, R.L., and Gewurz, H. (1982). Binding of human C-reactive protein to bacteria. *Infect. Immun.* 38, 392–395. **(Citado en página 25)**

BIBLIOGRAFÍA

- Monk, A. b., Rees, C. d., Barrow, P., Hagens, S., and Harper, D. r. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology* 51, 363–369. **(Citado en página 37)**
- Monterroso, B., Sáiz, J.L., García, P., García, J.L., and Menéndez, M. (2008). Insights into the Structure-Function Relationships of Pneumococcal Cell Wall Lysozymes, LytC and Cpl-1. *J. Biol. Chem.* 283, 28618–28628. **(Citado en páginas 32, 89, 90, 93 y 101 y 194)**
- Morales, M. (2014). Estudios moleculares del gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae*, y otros estreptococos relacionados, y su aplicación en epidemiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. **(Citado en página 26)**
- Morales, M., García, P., de la Campa, A.G., Liñares, J., Ardanuy, C., and García, E. (2010). Evidence of localized prophage-host recombination in the *lytA* gene, encoding the major pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* 192, 2624–2632. **(Citado en página 30)**
- Morens, D.M., Folkers, G.K., and Fauci, A.S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430, 242–249. **(Citado en página 7)**
- Morgenroth, J., and Levi, R. (1911). Chemotherapie der pneumokokkeninfektion. *Berliner Klinische Wochenschrift* 34, 1560–1561. **(Citado en página 7)**
- Moscoso, M., Obregón, V., López, R., García, J.L., and García, E. (2005). Allelic variation of polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8706–8713. **(Citado en páginas 26, 28 y 28)**
- Moscoso, M., García, E., and López, R. (2006). Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion. *J. Bacteriol.* 188, 7785–7795. **(Citado en página 52)**
- Mosser, J.L., and Tomasz, A. (1970). Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* 245, 287–298. **(Citado en páginas 7 y 80)**
- Moynihan, P.J., Sychantha, D., and Clarke, A.J. (2014). Chemical biology of peptidoglycan acetylation and deacetylation. *Bioorg. Chem.* 54, 44–50. **(Citado en página 22)**
- Muñoz-Almagro, C., Jordan, I., Gene, A., Latorre, C., Garcia-Garcia, J.J., and Pallares, R. (2008). Emergence of Invasive Pneumococcal Disease Caused by Nonvaccine Serotypes in the Era of 7-Valent Conjugate Vaccine. *Clin Infect Dis.* 46, 174–182. **(Citado en página 12)**

- Muñoz-Almagro, C., Esteva, C., Fernandez de Sevilla, M., Selva, L., Gene, A., and Pallares, R. (2009). Emergence of invasive pneumococcal disease caused by multidrug-resistant serotype 19A among children in Barcelona. *Journal of Infection* 59, 75–82. **(Citado en página 10)**
- Musher, D.M., Bartlett, J.G., and Doern, G.V. (2001). A fresh look at the definition of susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to beta-lactam antibiotics. *Arch. Intern. Med.* 161, 2538–2544. **(Citado en página 13)**

N

- Nelson, D., Loomis, L., and Fischetti, V.A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4107–4112. **(Citado en página 38)**
- Neufeld, F. (1900). Über eine spezifische bakteriolytische Wirkung der Galle. *Z. Hyg Infektionskr* 34, 454–464. **(Citado en página 7)**
- Neufeld, F. (1902). Ueber die Agglutination der Pneumokokken und uber die Theorien der Agglutination. *Zeitschrift Fur Hygiene Infektionskrankheiten* 40, 54–72. **(Citado en página 7)**
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 686–723. **(Citado en página 25)**

O

- O'Brien, K.L., Hochman, M., and Goldblatt, D. (2007). Combined schedules of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines: is hyporesponsiveness an issue? *Lancet Infect Dis* 7, 597–606. **(Citado en página 11)**
- Ogawa, Y., Ooka, T., Shi, F., Ogura, Y., Nakayama, K., Hayashi, T., and Shimoji, Y. (2011). The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J. Bacteriol.* 193, 2959–2971. **(Citado en página 26)**

BIBLIOGRAFÍA

- Oliveira, H., Thiagarajan, V., Walmagh, M., Sillankorva, S., Lavigne, R., Neves-Petersen, M.T., Kluskens, L.D., and Azeredo, J. (2014). A thermostable Salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PLoS ONE* 9, e108376. **(Citado en página 40)**
- Oliveira, M., Abadias, M., Colás-Medà, P., Usall, J., and Viñas, I. (2015). Bio-preservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 4–11. **(Citado en página 38)**
- Ortega, A., Amorós, D., and García de la Torre, J. (2011). Prediction of Hydrodynamic and Other Solution Properties of Rigid Proteins from Atomic- and Residue-Level Models. *Biophys J* 101, 892–898. **(Citado en página 79)**
- Ouennane, S., Leprohon, P., and Moineau, S. (2015). Diverse Virulent Pneumophages Infect *Streptococcus mitis*. *PLoS One* 10. **(Citado en página 19)**

P

- Pai, C.-H., Chiang, B.-Y., Ko, T.-P., Chou, C.-C., Chong, C.-M., Yen, F.-J., Chen, S., Coward, J.K., Wang, A.H.-J., and Lin, C.-H. (2006). Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *EMBO J.* 25, 5970–5982. **(Citado en páginas 35, 36 y 192)**
- Paradiso, P.R. (2011). Advances in pneumococcal disease prevention: 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for infants and children. *Clin. Infect. Dis.* 52, 1241–1247. **(Citado en página 11)**
- Pastagia, M., Euler, C., Chahales, P., Fuentes-Duculan, J., Krueger, J.G., and Fischetti, V.A. (2011). A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 738–744. **(Citado en páginas 38 y 40)**
- Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V.A., and Huang, D.B. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol* 62, 1506–1516. **(Citado en páginas 20 y 39)**
- Pasteur, L. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull. Acad. Med. (Paris)* 10, 94–103. **(Citado en páginas 5 y 8)**
- Pasteur, L., Chamberland, C., and Roux, P.P.E. (1881). Sur une maladie nouvelle, provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 92, 159–165. **(Citado en página 5)**

- Pedersen, K.O. (1983). The Svedberg and Arne Tiselius the early development of modern protein chemistry at Uppsala. In *Comprehensive Biochemistry*, L.L.M.V.D. and G.S. Albert NEUBERGER, ed. (Elsevier), pp. 233–281. **(Citado en página 72)**
- Pedulla, M.L., Ford, M.E., Houtz, J.M., Karthikeyan, T., Wadsworth, C., Lewis, J.A., Jacobs-Sera, D., Falbo, J., Gross, J., Pannunzio, N.R., *et al.* (2003). Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* 113, 171–182. **(Citado en página 18)**
- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., Mobashery, S., García, J.L., Martínez-Ripoll, M., García, P., *et al.* (2010). Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 576–581. **(Citado en páginas 30, 31 y 32)**
- Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2005). Global Rigid Body Modeling of Macromolecular Complexes against Small-Angle Scattering Data. *Biophys J* 89, 1237–1250. **(Citado en páginas 76, 79 y 122)**
- Petoukhov, M.V., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., and Svergun, D.I. (2007). AT-SAS 2.1 – towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst, J Appl Crystallogr* 40, s223–s228. **(Citado en página 78)**
- Porod, G. (1982). General Theory. In *Small-Angle X-Ray Scattering*, Glatter, O., and Kratky, O., eds. (London Academic Press), pp. 17–51. **(Citado en página 78)**
- Prevaes, S.M.P.J., van Wamel, W.J.B., de Vogel, C.P., Veenhoven, R.H., van Gils, E.J.M., van Belkum, A., Sanders, E.A.M., and Bogaert, D. (2012). Nasopharyngeal colonization elicits antibody responses to staphylococcal and pneumococcal proteins that are not associated with a reduced risk of subsequent carriage. *Infect. Immun.* 80, 2186–2193. **(Citado en página 12)**
- Privalov, P.L. (1979). Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33, 167–241. **(Citado en página 70)**
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2006). Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313, 89–92. **(Citado en página 12)**
- Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., and Tainer, J.A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* 40, 191–285. **(Citado en páginas 75, 76, 77 y 118)**

R

- Ralston, G. (1993). Introduction to analytical ultracentrifugation (Beckman Instruments Inc., CA). **(Citado en página 73)**
- Ramirez, M., Severina, E., and Tomasz, A. (1999). A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 181, 3618–3625. **(Citado en página 17)**
- Ramos-Sevillano, E., Rodriguez-Sosa, C., Diez-Martinez, R., Gimenez, M.-J., Olmedillas, E., Garcia, P., Garcia, E., Aguilar, L., and Yuste, J. (2012). Macrolides and B-lactam antibiotics enhance c3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus Pneumoniae* strains by a Lyta autolysin-dependent mechanism. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 56, 5534–5540. **(Citado en páginas 52 y 151)**
- Rane, L., and Subbarow, Y. (1940). Nutritional Requirements of the Pneumococcus. J Bacteriol 40, 695–704. **(Citado en páginas 7 y 25)**
- Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J., and Galperin, M.Y. (2003). Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of γ -D,L-glutamate-specific amidohydrolases. Trends in Biochemical Sciences 28, 230–234. **(Citado en páginas 35 y 192)**
- Rigvava, S., Tchgonia, I., Jgenti, D., Dvalidze, T., Carpino, J., and Goderdzishvili, M. (2013). Comparative analysis of the biological and physical properties of *Enterococcus faecalis* bacteriophage vB_EfaS_GEC-EfS_3 and *Streptococcus mitis* bacteriophage vB_SmM_GEC-SmitisM_2. Can. J. Microbiol. 59, 18–21. **(Citado en página 18)**
- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Del Prado, G., García, E., Gracia, M., Huelves, L., Ponte, C., López, R., and Soriano, F. (2007a). In vitro interactions of LytA, the major pneumococcal autolysin, with two bacteriophage lytic enzymes (Cpl-1 and Pal), cefotaxime and moxifloxacin against antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. J. Antimicrob. Chemother. 60, 1159–1162. **(Citado en página 40)**
- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Huelves, L., García, E., del Prado, G., Gracia, M., Ponte, C., López, R., and Soriano, F. (2007b). Pneumococcal LytA Autolysin, a Potent Therapeutic Agent in Experimental Peritonitis-Sepsis Caused by Highly β -Lactam-Resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 51, 3371–3373. **(Citado en página 40)**
- Romero, P., Lopez, R., and Garcia, E. (2004). Characterization of LytA-Like N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidases from Two New *Streptococcus mitis* Bacteriophages Provides Insights into the Properties of the Major Pneumococcal Autolysin. Journal of Bacteriology 186, 8229–8239. **(Citado en páginas 18, 27, 28 y 34)**

- Romero, P., López, R., and García, E. (2007). Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 282, 17729–17737. **(Citado en páginas 34, 115, 116 y 202)**
- Romero, P., Croucher, N.J., Hiller, N.L., Hu, F.Z., Ehrlich, G.D., Bentley, S.D., García, E., and Mitchell, T.J. (2009a). Comparative Genomic Analysis of Ten *Streptococcus pneumoniae* Temperate Bacteriophages. *J. Bacteriol* 191, 4854–4862. **(Citado en página 18)**
- Romero, P., García, E., and Mitchell, T.J. (2009b). Development of a Prophage Typing System and Analysis of Prophage Carriage in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 75, 1642–1649. **(Citado en página 18)**
- Ronda, C., García, J.L., and López, R. (1989). Infection of *Streptococcus oralis* NCTC 11427 by pneumococcal phages. *FEMS Microbiol. Lett.* 53, 187–192. **(Citado en página 19)**
- Rossi, P., Aramini, J.M., Xiao, R., Chen, C.X., Nwosu, C., Owens, L.A., Maglaqui, M., Nair, R., Fischer, M., Acton, T.B., *et al.* (2009). Structural Elucidation of the Cys-His-Glu-Asn Proteolytic Relay in the Secreted CHAP Domain Enzyme from the Human Pathogen *Staphylococcus saprophyticus*. *Proteins* 74, 515–519. **(Citado en páginas 35, 36, 37, 104, 106, 190, 192 y 194)**
- Rost, B., Yachdav, G., and Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* 32, W321–W326. **(Citado en página 80)**
- Rukke, H.V., Hegna, I.K., and Petersen, F.C. (2012). Identification of a functional capsule locus in *Streptococcus mitis*. *Mol Oral Microbiol* 27, 95–108. **(Citado en páginas 14 y 15)**
- Rukke, H.V., Kalluru, R.S., Repnik, U., Gerlini, A., José, R.J., Periselneris, J., Marshall, H., Griffiths, G., Oggioni, M.R., Brown, J.S., *et al.* (2014). Protective Role of the Capsule and Impact of Serotype 4 Switching on *Streptococcus mitis*. *Infect Immun* 82, 3790–3801. **(Citado en página 15)**

S

- Sáiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Varea, J., Arrondo, J.L.R., Iloro, I., García, J.L., Laynez, J., and Menéndez, M. (2002). Characterization of Ejl, the cell-wall amidase coded by the pneumococcal bacteriophage Ej-1. *Protein Science* 11, 1788–1799. **(Citado en página 97 y 200)**
- Sali, A., and Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815. **(Citado en páginas 80 y 80)**

BIBLIOGRAFÍA

- Salton, M.R.J. (1994). The bacterial cell envelope - a historical perspective. In New Comprehensive Biochemistry, J.-M.G. and R. Hakenbeck, ed. (Elsevier), pp. 1–22. **(Citado en página 20)**
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (CSHL Press). **(Citado en página 57)**
- Sanchez, C.J., Hinojosa, C.A., Shivshankar, P., Hyams, C., Camberlein, E., Brown, J.S., and Orihuela, C.J. (2011). Changes in Capsular Serotype Alter the Surface Exposure of Pneumococcal Adhesins and Impact Virulence. PLoS One 6. **(Citado en página 10)**
- Sánchez-Puelles, J., Sanz, J.M., García, J., and García, E. (1990). Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. Gene 89, 69–75. **(Citado en páginas 30 y 65)**
- Sanchez-Puelles, J.M., Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, P., Lopez, R., and Garcia, E. (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. Eur. J. Biochem. 158, 289–293. **(Citado en página 25)**
- Sanchez-Ruiz, J.M. (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. Biophys. J. 61, 921–935. **(Citado en página 70 y 72)**
- Sánchez-Tatay, D., Arroyo, L.A., Tarragó, D., Lirola, M.J., Porras, A., Fenoll, A., Hausdorff, W.P., Brueggemann, A.B., and Obando, I. (2008). Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of nasopharyngeal pneumococci from Spanish children. Clinical Microbiology and Infection 14, 797–801. **(Citado en página 16)**
- Sanders, M.S., van Well, G.T.J., Ouburg, S., Morré, S.A., and van Furth, A.M. (2011). Genetic variation of innate immune response genes in invasive pneumococcal and meningococcal disease applied to the pathogenesis of meningitis. Genes Immun. 12, 321–334. **(Citado en página 8)**
- Sanz, J.M., Díaz, E., and García, J.L. (1992). Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. Mol. Microbiol. 6, 921–931. **(Citado en página 30)**
- Sanz, J.M., García, J.L., Laynez, J., Usobiaga, P., and Menéndez, M. (1993). Thermal stability and cooperative domains of Cpl-1 lysozyme and its NH₂- and COOH-terminal modules. Dependence on choline binding. J. Biol. Chem. 268, 6125–6130. **(Citado en página 30)**
- Sanz-Gaitero, M., Keary, R., Garcia-Doval, C., Coffey, A., and van Raaij, M.J. (2014). Crystal structure of the lytic CHAP_K domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. Virol J 11, 133. **(Citado en páginas 35, 36, 188, 190, 191 y 192)**
- Schachman, H.K. (1989). Analytical ultracentrifugation reborn. Nature 341, 259–260. **(Citado en página 72)**

- Schachtele, C.F., Nobbs, A.H., Zhang, Y., Costalonga, M., and Herzberg, M.C. (2007). Oral streptococci: commensals and opportunistic pathogens. (Horizon Bioscience), p. 411–462. **(Citado en página 4)**
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* 36, 407–477. **(Citado en página 22)**
- Schmelcher, M., Powell, A.M., Camp, M.J., Pohl, C.S., and Donovan, D.M. (2015). Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(Citado en página 38)**
- Schneider, R.F. (1999). Bacterial pneumonia. *Semin Respir Infect* 14, 327–332. **(Citado en página 7)**
- Schuch, R., Nelson, D., and Fischetti, V.A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418, 884–889. **(Citado en páginas 38 y 185)**
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78, 1606–1619. **(Citado en página 74)**
- Seo, H.S., Cartee, R.T., Pritchard, D.G., and Nahm, M.H. (2008). A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. *J. Bacteriol.* 190, 2379–2387. **(Citado en página 25)**
- Seo, H.S., Xiong, Y.Q., Mitchell, J., Seepersaud, R., Bayer, A.S., and Sullam, P.M. (2010). Bacteriophage lysin mediates the binding of *Streptococcus mitis* to human platelets through interaction with fibrinogen. *PLoS Pathog.* 6, e1001047. **(Citado en páginas 15 y 16)**
- Sharma, M. (2013). Lytic bacteriophages: Potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce. *Bacteriophage* 3, e25518. **(Citado en página 37)**
- Shaukat, S., and Buchner, R. (2011). Densities, Viscosities [from (278.15 to 318.15) K], and Electrical Conductivities (at 298.15 K) of Aqueous Solutions of Choline Chloride and Chloro-Choline Chloride. *J. Chem. Eng. Data* 56, 4944–4949. **(Citado en página 74)**
- Sheehan, M.M., García, J.L., López, R., and García, P. (1997). The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Molecular Microbiology* 25, 717–725. **(Citado en página 30)**
- Shelburne, S.A., Sahasrabhojane, P., Saldana, M., Yao, H., Su, X., Horstmann, N., Thompson, E., and Flores, A.R. (2014). *Streptococcus mitis* strains causing severe clinical disease in cancer patients. *Emerging Infect. Dis.* 20, 762–771. **(Citado en página 15)**

BIBLIOGRAFÍA

- Siboo, I.R., Bensing, B.A., and Sullam, P.M. (2003). Genomic organization and molecular characterization of SM1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus mitis*. J. Bacteriol. 185, 6968–6975. **(Citado en páginas 28 y 30)**
- Slotved, H.-C., and Satzke, C. (2013). In vitro growth of pneumococcal isolates representing 23 different serotypes. BMC Research Notes 6, 208. **(Citado en página 56)**
- Sokabe, M., Kawamura, T., Sakai, N., Yao, M., Watanabe, N., and Tanaka, I. (2002). The X-ray crystal structure of pyrrolidone-carboxylate peptidase from hyperthermophilic archaea *Pyrococcus horikoshii*. J. Struct. Funct. Genomics 2, 145–154. **(Citado en páginas 106 y 192)**
- Sørensen, U.B., and Blom, J. (1992). Capsular polysaccharide is linked to the outer surface of type 6A pneumococcal cell walls. APMIS 100, 891–893. **(Citado en página 9)**
- Spellerberg, B., and Brandt, C. (2011). Streptococcus. In Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition, J. Versalovic, J.H. Jorgensen, G. Funke, D.W. Warnock, M.L. Landry, and K.C. Carroll, eds. (American Society of Microbiology), pp. 331–349. **(Citado en página 4)**
- Steel, H.C., Cockeran, R., Anderson, R., and Feldman, C. (2013). Overview of Community-Acquired Pneumonia and the Role of Inflammatory Mechanisms in the Immunopathogenesis of Severe Pneumococcal Disease. Mediators of Inflammation 2013, e490346. **(Citado en página 8)**
- Sternberg (1881). A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. Natl. Board Health Bull. 2, 781–783. **(Citado en página 5)**
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113–130. **(Citado en página 52)**
- Sturino, J.M., and Klaenhammer, T.R. (2006). Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. Nat Rev Micro 4, 395–404. **(Citado en página 18)**
- Sulakvelidze, A., and Morris, J.G. (2001). Bacteriophages as therapeutic agents. Ann. Med. 33, 507–509. **(Citado en página 20)**
- Summers, W.C. (2001). Bacteriophage Therapy. Annual Review of Microbiology 55, 437–451. **(Citado en páginas 17, 20 y 37)**
- Summers, W.C. (2012). The strange history of phage therapy. Bacteriophage 2, 130–133. **(Citado en página 37)**
- Svergun, D.I. (1992). Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. Journal of Applied Crystallography 25, 495–503. **(Citado en página 76)**
- Svergun, D.I. (1999). Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. Biophys J 76, 2879–2886. **(Citado en páginas 76 y 78)**

- Svergun, D.I., and Koch, M.H.J. (2002). Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Current Opinion in Structural Biology* 12, 654–660. **(Citado en página 76)**
- Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M.H.J. (1995). CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *Journal of Applied Crystallography* 28, 768–773. **(Citado en página 79)**
- Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., and Koch, M.H. (2001). Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* 80, 2946–2953. **(Citado en página 76)**

T

- Tabor, S. (2001). Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. In *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, Inc.). **(Citado en página 54)**
- Tarahomjoo, S. (2014). Recent Approaches in Vaccine Development against *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 24, 215–227. **(Citado en página 12)**
- Thandar, M., Lood, R., Winer, B.Y., Deutsch, D.R., Euler, C.W., and Fischetti, V.A. (2016). Novel engineered peptides of a phage lysin as effective antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* AAC.02972-15. **(Citado en página 40)**
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882. **(Citado en página 79)**
- Tillett, W.S., Cambier, M.J., and McCormack, J.E. (1944). The Treatment of Lobar Pneumonia and Pneumococcal Empyema with Penicillin. *Bull N Y Acad Med* 20, 142–178. **(Citado en página 12)**
- To, H., and Nagai, S. (2007). Genetic and Antigenic Diversity of the Surface Protective Antigen Proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin Vaccine Immunol* 14, 813–820. **(Citado en página 26)**
- Tomasz, A. (1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* 157, 694–697. **(Citado en página 6)**

BIBLIOGRAFÍA

- Tomasz, A. (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 86–93. **(Citado en página 25)**
- Trudil, D. (2015). Phage lytic enzymes: a history. *Virol. Sin.* 30, 26–32. **(Citado en página 38)**
- Tunkel, A.R., and Sepkowitz, K.A. (2002). Infections caused by viridans streptococci in patients with neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* 34, 1524–1529. **(Citado en página 15)**
- Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B., and Zak, O. (1985). The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* 151, 535–540. **(Citado en página 20)**
- Tuomanen, E., Rich, R., and Zak, O. (1987). Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 869–874. **(Citado en página 20)**
- Twort, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet* 186, 1241–1243. **(Citado en página 17)**

U

- Usobiaga, P., Medrano, F.J., Gasset, M., García, J.L., Saiz, J.L., Rivas, G., Laynez, J., and Menéndez, M. (1996). Structural Organization of the Major Autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 271, 6832–6838. **(Citado en páginas 30, 32, 34, 72, 89, 96, 138, 140, 194, 195 y 199)**

V

- Vandenheuvel, D., Lavigne, R., and Brüssow, H. (2015). Bacteriophage Therapy: Advances in Formulation Strategies and Human Clinical Trials. *Annu Rev Virol* 2, 599–618. **(Citado en página 20)**
- Varea, J., Saiz, J.L., López-Zumel, C., Monterroso, B., Medrano, F.J., Arrondo, J.L.R., Iloro, I., Laynez, J., García, J.L., and Menendez, M. (2000). Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase? *Journal of Biological Chemistry*. **(Citado en páginas 34, 89, 96, 97, 132, 144, 194, 200 y 202)**

- Varea, J., Monterroso, B., Sáiz, J.L., López-Zumel, C., García, J.L., Laynez, J., García, P., and Menéndez, M. (2004). Structural and Thermodynamic Characterization of Pal, a Phage Natural Chimeric Lysin Active against Pneumococci. *J. Biol. Chem.* 279, 43697–43707. **(Citado en páginas 70, 72, 89, 90, 92, 96, 101, 194, 196 y 200)**
- Veiga-Crespo, P., Ageitos, J.M., Poza, M., and Villa, T.G. (2007). Enzybiotics: a look to the future, recalling the past. *J Pharm Sci* 96, 1917–1924. **(Citado en página 38)**
- Volkov, V.V., and Svergun, D.I. (2003). Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* 36, 860–864. **(Citado en página 78)**
- Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 287–306. **(Citado en páginas 21, 22 y 39)**
- Vollmer, W., and Seligman, S.J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* 18, 59–66. **(Citado en página 22)**
- Vollmer, W., and Tomasz, A. (2000). The pgdA gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 275, 20496–20501. **(Citado en página 22)**
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 259–286. **(Citado en página 26)**
- Vouillamoz, J., Entenza, J.M., Giddey, M., Fischetti, V.A., Moreillon, P., and Resch, G. (2013). Bactericidal synergism between daptomycin and the phage lysin Cpl-1 in a mouse model of pneumococcal bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 416–421. **(Citado en página 40)**

W

- Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J. (1996). Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science* 272, 1910–1914. **(Citado en página 17)**
- Walmagh, M., Boczkowska, B., Grymonprez, B., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., and Lavigne, R. (2013). Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4369–4375. **(Citado en página 40)**
- Walsh, C. (1979). *Enzymatic reaction mechanisms* (New York, WH Freeman). **(Citado en páginas 187 y 190)**

BIBLIOGRAFÍA

- Watkins, E.R., Penman, B.S., Lourenço, J., Buckee, C.O., Maiden, M.C.J., and Gupta, S. (2015). Vaccination Drives Changes in Metabolic and Virulence Profiles of *Streptococcus pneumoniae*. PLoS Pathog 11. **(Citado en página 12)**
- Weber, G. (1992). Protein interactions (Chapman and Hall New York). **(Citado en página 72)**
- Weidel, W., and Pelzer, H. (1964). Bagshaped Macromolecules. A new outlook on bacterial cell walls. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 26, 193–232. **(Citado en página 21)**
- Weidenmaier, C., and Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. Nat. Rev. Microbiol. 6, 276–287. **(Citado en página 25)**
- Weinberger, D.M., Harboe, Z.B., Sanders, E.A.M., Ndiritu, M., Klugman, K.P., Rückinger, S., Dagan, R., Adegbola, R., Cutts, F., Johnson, H.L., *et al.* (2010). Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 51, 692–699. **(Citado en página 8)**
- Weinberger, D.M., Malley, R., and Lipsitch, M. (2011). Serotype replacement in disease following pneumococcal vaccination: A discussion of the evidence. Lancet 378, 1962–1973. **(Citado en página 12)**
- Weiser, J.N. (2010). The pneumococcus: why a commensal misbehaves. J. Mol. Med. 88, 97–102. **(Citado en página 8)**
- Welch, H., Borman, E.K., and Mickle, F.L. (1939). Preparation and Analysis of Diagnostic Antipneumococcus Serum. American Journal of Public Health and the Nations Health 29, 35. **(Citado en página 10)**
- Weycker, D., Strutton, D., Edelsberg, J., Sato, R., and Jackson, L.A. (2010). Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. Vaccine 28, 4955–4960. **(Citado en página 7)**
- Williams, J.D. (2002). *Streptococcus pneumoniae* still going strong. Int. J. Antimicrob. Agents 20, 75. **(Citado en página 7)**
- Witzenrath, M., Schmeck, B., Doehn, J.M., Tschernig, T., Zahlten, J., Loeffler, J.M., Zemlin, M., Müller, H., Gutbier, B., Schütte, H., *et al.* (2009). Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. Crit. Care Med. 37, 642–649. **(Citado en página 39)**
- Woody, R.W. (1995). Circular dichroism. Meth. Enzymol. 246, 34–71. **(Citado en página 66)**
- World Health Organization (2013). Weekly epidemiological record. 88, 117–128. **(Citado en página 7)**
- World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. **(Citado en página 12)**
- World Health Organization (2016a). WHO | Resistencia a los antibióticos. **(Citado en página 3)**

- World Health Organization (2016b). WHO | Pneumonia. **(Citado en página 7)**
- World Health Organization (2017). WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **(Citado en páginas 3 y 13)**
- Wurch, T., Lestienne, F., and Pauwels, P.J. (1998). A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology Techniques* 12, 653–657. **(Citado en página 59)**
- Wyman, J., and Gill, S.J. (1990). *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science Books). **(Citado en página 72)**
- Wyres, K.L., Lambertsen, L.M., Croucher, N.J., McGee, L., von Gottberg, A., Liñares, J., Jacobs, M.R., Kristinsson, K.G., Beall, B.W., Klugman, K.P., *et al.* (2012). The multidrug-resistant PMEN1 pneumococcus is a paradigm for genetic success. *Genome Biol.* 13, R103. **(Citado en página 10)**
- Wyres, K.L., Lambertsen, L.M., Croucher, N.J., McGee, L., von Gottberg, A., Liñares, J., Jacobs, M.R., Kristinsson, K.G., Beall, B.W., Klugman, K.P., *et al.* (2013). Pneumococcal capsular switching: a historical perspective. *J. Infect. Dis.* 207, 439–449. **(Citado en página 10)**

Y

- Yang, H., Yu, J., and Wei, H. (2014a). Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Front Microbiol* 5. **(Citado en página 40)**
- Yang, H., Zhang, Y., Yu, J., Huang, Y., Zhang, X.-E., and Wei, H. (2014b). Novel Chimeric Lysin with High-Level Antimicrobial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 536–542. **(Citado en página 40)**
- Yother, J. (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 563–581. **(Citado en páginas 9 y 131)**
- Young, R. (1992). Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 56, 430–481. **(Citado en página 20)**
- Young, R. (2014). Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* 52, 243–258. **(Citado en páginas 19 y 20)**
- Young, I., Wang, I., and Roof, W.D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* 8, 120–128. **(Citado en página 19)**

BIBLIOGRAFÍA

Young, N.M., Foote, S.J., and Wakarchuk, W.W. (2013). Review of phosphocholine substituents on bacterial pathogen glycans: synthesis, structures and interactions with host proteins. *Mol. Immunol.* 56, 563–573. **(Citado en página 26)**

Z

Zhang, G., Wang, C., Sui, Z., and Feng, J. (2015). Insights into the evolutionary trajectories of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2499–2506. **(Citado en página 13)**

Zhang, L., Li, D., Li, X., Hu, L., Cheng, M., Xia, F., Gong, P., Wang, B., Ge, J., Zhang, H., *et al.* (2016). LysGH15 kills *Staphylococcus aureus* without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation. *Scientific Reports* 6, 29344. **(Citado en página 39)**

ANEXO

8

Tabla 8.1. Productos químicos, enzimas y reactivos utilizados

Suministrador	Compuesto
<i>Amersham Pharmacia</i>	Colina tritiada (60 Ci/mmol) Enzimas de restricción Marcadores de peso molecular DNA
<i>Applied biosystems</i>	Apomioglobina (Sequazyme Peptide Mass Standards Kit)
<i>Beckman Coulter</i>	Líquido de centelleo
<i>Becton, Dickinson & Co.</i>	Medio Mueller-Hinton II ajustado en cationes
<i>Bio-Rad</i>	Acrilamida/bis-acrilamida Azul de Coomassie BSA Formaldehído Patrones de peso molecular de proteínas (SDS-PAGE) Persulfato amónico Quantum Prep® Plasmid Kit SDS
<i>Biotium</i>	Gel Red™
<i>Biotoools</i>	Marcadores de peso molecular DNA Taq DNA polimerasa
<i>Boehringer Mannheim</i>	Enzimas de restricción
<i>Fluka</i>	Azida sódica Ácido fosfórico Ácido sinapínico EDTA TFA
<i>Difco</i>	Medio Todd-Hewitt
<i>Merck</i>	Ácido acético β-mercaptoetanol Centriprep®-Millipore YM-10 MW
<i>Millipore</i>	Filtros estériles 0,2 µm
<i>MP Biomedicals</i>	GeneClean Turbo kit

(Tabla 8.1, continuación)

Suministrador	Compuesto
<i>New England BioLabs</i>	Enzimas de restricción Marcadores de peso molecular DNA
<i>Oxoid</i>	Sangre desfibrinada de carnero
<i>Pronadisa</i>	Componentes medios de cultivo Agarosa
<i>Promega</i>	<i>Pfu</i> DNA polimerasa
<i>Qiagen</i>	QIAquick Gel Extraction Kit
<i>Riedel-de Haën</i>	Acetonitrilo
<i>Roche</i>	High Pure™ PCR Product Purification Kit High Pure plasmid Isolation Kit Inhibidores de proteasas libres de EDTA IPTG
<i>Scharlau</i>	Ácido clorhídrico Cloruro sódico Tris-(hidroximetil)-aminometano
<i>Sigma-Aldrich</i>	Ampicilina Cloruro de colina DEAE-celulosa Fosfato monosódico y disódico L- α -glicerofosforilcolina Glicerol Glicina Metanol MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico) Oligonucleótidos Sulfato de estreptomicina
<i>Spectrum</i>	Membranas de diálisis
<i>Thermo Scientific</i>	D'TT (ditiotreititol) Temed

(Tabla 8.1, continuación)

Suministrador	Compuesto
Takara	T4-DNA ligasa
	Enzimas de restricción

Tabla 8.2. Herramientas informáticas utilizadas en este trabajo

Utilidad	Programa	Dirección web/compañía
Búsqueda homologías	DELTA-BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Visualización y análisis de secuencias	JALVIEW	http://www.jalview.org/
Análisis de la conservación	ConSurf	http://consurf.tau.ac.il/2016/
Diseño oligonucleótidos	Gentle	http://gentle.magnusmanske.de/
Lectura secuencias DNA	Chromas	http://technelysium.com.au/wp/chromas/
Clasificación de dominios	Pfam	http://pfam.xfam.org/
Cálculo parámetros físico-químicos de proteínas	ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
Alineamiento secuencias aminoacídicas	CLUSTAL O	http://www.ebi.ac.uk
	MUSCLE	https://toolkit.tuebingen.mpg.de
	Deep View	http://spdbv.vital-it.ch/
Predicción estructura secundaria proteínas	PsiPred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
	J-Pred	http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/
	Predict Protein	https://www.predictprotein.org/

(Tabla 8.2, continuación)

Utilidad	Programa	Dirección web/compañía
Construcción modelos 3D de proteínas	Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/
	Phyre	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/
	HH-Pred	http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred
	I-TASSER	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/
	MODELLER	http://salilab.org/modeller/
Evaluación modelos 3D	PROCHECK	http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/
	VERIFY-3D	http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/
Tratamiento datos SAXS y construcción de modelos	ATSAS program suite	http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html
	Collaborative Computational Project for Fiber Diffraction and Solution Scattering	http://www.ccp13.ac.uk/software/software.htm
Visualización y superposición de estructuras 3D	PyMol	http://www.pymol.org
Análisis experimentos de velocidad de sedimentación	SEDFIT	http://www.analyticalultracentrifugation.com

(Tabla 8.2, continuación)

Utilidad	Programa	Dirección web/compañía
Cálculo de densidades, volúmenes específicos, viscosidades y parámetros hidrodinámicos de proteínas	SEDNTERP	http://www.jphilo.mailway.com
Análisis experimentos de equilibrio de sedimentación	Hetero Analysis	http://www.biotech.uconn.edu/auf/?i=aufftp
Cálculo coeficientes de sedimentación teóricos	HYDRO++	http://leonardo.inf.um.es/macromol/programs/hydro++/hydro++.htm
	HYDROPRO	http://leonardo.inf.um.es/macromol/programs/hydropro/hydropro.htm
Recogida de datos y análisis de espectros de dicroísmo circular (DC)	Spectra Manager	Jasco
Recogida y análisis de datos de calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Microcal LLC, DSC	MicroCal
Ajustes matemáticos y representaciones gráficas	Origin (v. 6.0 y 7.0)	MicroCal
Análisis estadísticos	STATISTICA (v. 6.0)	StatSoft

Tabla 8.3. Secuencias de aminoácidos de Skl, LytA, QLAS1 y QSLA2. Azul: N-Skl; Morado: CBM de Skl; Rojo: N-LytA; Verde: CBM LytA; linkers en negro.

Skl (288 aa)

MSKKQEMIQFFIDKANAGDGVNDGAYGFQCADVPCYGLRHWYGVTLWGNAYDLL
ESARSQGLKVVDADYPKAGWFFVKSYVAGDGVNYGHTGLVYEDSDGYTIKTIEQ
NIDGNWDYLEVGGPCRYNERSVDEIVGYIVPPEEVETGWQQNQYGWVWVREDGSY
PTEKWEKINDAWYYFDDKGFMRSTWLNKYDAWYWFTDSGSMATGWARINNAWYY
FDEEGKMTGWIKHKLTWYYLDHKNGNMVSNFSVQSADKKGWYYIKADGTMADKP
EFTVEPEGLITTK

LytA (318 aa)

MEINVSklRtDLPQVGVQPYRQVHAHSTGNPHSTVQNEADYHWRKDPGLGFFSHI
VGNGCIMQVGPVDNGAWDVGGGWNAAETAAVELIESHSTKEEFMTDYRLYIELLR
NLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNHSDHVDPPYLAKWGISREQFK
HDIENGLTIETGWQKNDTGYWVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRW
RKHTDGNWYWFNDNGEMATGWKKIADKWYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKE
GAMVSNAFIQSADGTGWYYLKP DGT LADKPEFTVEPDGLITVK

Quimera QLAS1 (módulo catalítico de LytA - CBM de Skl) (317 aa)

MEINVSklRtDLPQVGVQPYRQVHAHSTGNPHSTVQNEADYHWRKDPGLGFFSHI
VGNGCIMQVGPVDNGAWDVGGGWNAAETAAVELIESHSTKEEFMTDYRLYIELLR
NLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNHSDHVDPPYLAKWGISREQFK
HDIENGLTIETGWQKNDTGYWVREDGSYPTEKWEKINDAWYYFDDKGFMRSTW
LNKYDAWYWFTDSGSMATGWARINNAWYYFDEEGKMTGWIKHKLTWYYLDHKNG
NMVSNFSVQSADKKGWYYIKADGTMADKPEFTVEPEGLITTK

Quimera QSLA2 (módulo catalítico de Skl - CBM de LytA) (289 aa)

MSKKQEMIQFFIDKANAGDGVNDGAYGFQCADVPCYGLRHWYGVTLWGNAYDLL
ESARSQGLKVVDADYPKAGWFFVKSYVAGDGVNYGHTGLVYEDSDGYTIKTIEQ
NIDGNWDYLEVGGPCRYNERSVDEIVGYIVPPEEVETGWQQNQYGWVWVHSDGSY
PKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRW RKHTDGNWYWFNDNGEMATGWKKIADKWY
YFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGAMVSNAFIQSADGTGWYYLKP DGT LADK
PEFTVEPDGLITVK

Tabla 8.4. Secuencias de bases de los genes codificantes para *Skl*, *LytA*, *QLAS1* y *QSLA2*. Azul: N-*Skl*; Morado: CBM de *Skl*; Rojo: N-*LytA*; Verde: CBM *LytA*; linkers en negro.

***Skl* (5' → 3')**

ATGTCTAAAAAACAGGAAATGATTCAATTTTTTCATTGACAAGGCCAACGCAGGCG
ACGGAGTGGACAATGATGGAGCTTATGGCTTCCAGTGCGCTGACGTACCTTGTTA
CGGTCTTCGTCATTGGTATGGTGTGACCCTTTGGGGCAACGCTTATGACTTGCTC
GAATCAGCACGTTTACAAGGCTTGAAAGTCGTGTATGACGCTGACTATCCAAAGG
CTGGTTGGTTCTTCGTGAAATCATACGTAGCTGGCGACGGTGTCAATTACGGACA
TACTGGCCTTGTCTATGAGGACTCAGACGGCTATACCATCAAGACGATTGAGCAG
AACATCGATGGAAACTGGGACTACCTTGAAGTAGGTGGCCCTTGTCGCTACAATG
AGCGTTCTGTGCGATGAAATCGTTGGGTATATCGTACCGCCCGAAGAAGTCGAAAC
TGGCTGGCAACAAAACCAGTATGGTTGGTGGTGGGTTGTTTCGTGAAGACGGCTCT
TACCCAACTGAAAAATGGGAGAAAATCAACGACGCTTGGTACTATTTTCGACGATA
AAGGCTTCATGAAGCGTAGTACCTGGTTGAACTACAAGGACGCTTGGTACTGGTT
CACGGATTACGGGTCTATGGCAACTGGCTGGGCTCGTATCAATAATGCTTGGTAT
TACTTCGATGAAGAAGGGAAGATGGTCACTGGTTGGATTAAGCATAAGCTGACTT
GGTACTATCTTGATCATAAGAACGGCAACATGGTATCTAACTCATTTGTCCAATC
AGCTGATAAAAAAGGCTGGTACTACATTAAAGCAGATGGAACAATGGCGGATAAA
CCAGAGTTCACAGTTGAGCCAGAAGGCTTGATTACTACGAAATAG

***LytA* (5' → 3')**

ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGGCGTGCAAC
CATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGGGAATCCGCATTCAACCGTACAGAA
TGAAGCGGATTATCACTGGCGGAAAGACCCAGAATTAGGTTTTTTCTCGCACATT
GTTGGGAACGGTTGCATCATGCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACG
TTGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCA
TTCAACCAAAGAAGAGTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGC
AATCTAGCAGATGAAGCAGGTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTTAGCTG
GAATTA AACGCACGAGTATTGCACGAATAACCAACCAAACAACCACTCAGACCA
CGTTGACCCTTATCCATATCTTGCTAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGTTTAAG
CATGATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTGGCAGAAGAATGACACTG
GCTACTGGTACCATTTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAAATCAA
TGGCACTTGGTACTACTTTTGACAGTTTCAGGCTATATGCTTGACAGACCGCTGGAGG
AAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAACCTCAGGCGAAATGGCTACAG
GCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAA
GACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGC
GCCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACC
TCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGGCCAGAATTCACAGTAGAGCCAGATGG
CTTGATTACAGTAAAATAA

(Tabla 8.4. continuación)

Quimera QLAS1 (módulo catalítico de LytA - CBM de SkI)

ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGGCGTGCAAC
CATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGGGAATCCGCATTCAACCGTACAGAA
TGAAGCGGATTATCACTGGCGGAAAGACCCAGAATTAGGTTTTTTCTCGCACATT
GTTGGGAACGGTTGCATCATGCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACG
TTGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCA
TTCAACCAAAGAAGAGTTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGC
AATCTAGCAGATGAAGCAGGTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTTAGCTG
GAATTA AACGCACGAGTATTGCACGAATAACCAACCAAACAACCACTCAGACCA
CGTTGACCCTTATCCATATCTTGCTAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGTTTAAG
CATGATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAAGGCTGGCAGAAGAATGACACTG
GCTACTGGTACGTTTCGTGAAGACGGCTCTTACCCAACCTGAAAAATGGGAGAAAAAT
CAACGACGCTTGTTACTATTTTCGACGATAAAGGCTTCATGAAGCGTAGTACCTGG
TTGAACTACAAGGACGCTTGTTACTGGTTCACGGATTGAGGGTCTATGGCAACTG
GCTGGGCTCGTATCAATAATGCTTGGTATTACTTCGATGAAGAAGGGAAGATGGT
CACTGGTTGGATTAAGCATAAGCTGACTTGGTACTATCTTGATCATAAGAACGGC
AACATGGTATCTAACTCATTTGTCCAATCAGCTGATAAAAAAGGCTGGTACTACA
TTAAAGCAGATGGAACAATGGCGGATAAACCAGAGTTCACAGTTGAGCCAGAAGG
CTTGATTACTACGAAATAG

Quimera QSLA2 (módulo catalítico de SkI - CBM de LytA)

ATGTCTAAAAAACAGGAAATGATTCAATTTTTTCATTGACAAGGCCAACGCAGGCG
ACGGAGTGGACAATGATGGAGCTTATGGCTTCCAGTGCGCTGACGTACCTTGTTA
CGGTCTTCGTCATTGGTATGGTGTGACCCCTTTGGGGCAACGCTTATGACTTGCTC
GAATCAGCACGTTTACAAGGCTTGAAAGTCGTGTATGACGCTGACTATCCAAAGG
CTGGTTGGTTCTTCGTGAAATCATACGTAGCTGGCGACGGTGTCAATTACGGACA
TACTGGCCTTGCTATGAGGACTCAGACGGCTATACCATCAAGACGATTGAGCAG
AACATCGATGGAACTGGGACTACCTTGAAGTAGGTGGCCCTTGTCGCTACAATG
AGCGTTCTGTGATGAAATCGTTGGGTATATCGTACCGCCCGAAGAAGTCGAAAC
TGGCTGGCAACAAAACAGTATGGTTGGTGGTGGGTTATTTCAGACGGCTCTTAT
CCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTTACG
GCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTT
CGACAACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTAC
TATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTT
GGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTC
AGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGG
CCAGAATTACAGTAGAGCCAGATGGCTTGATTACAGTAAAAATAA

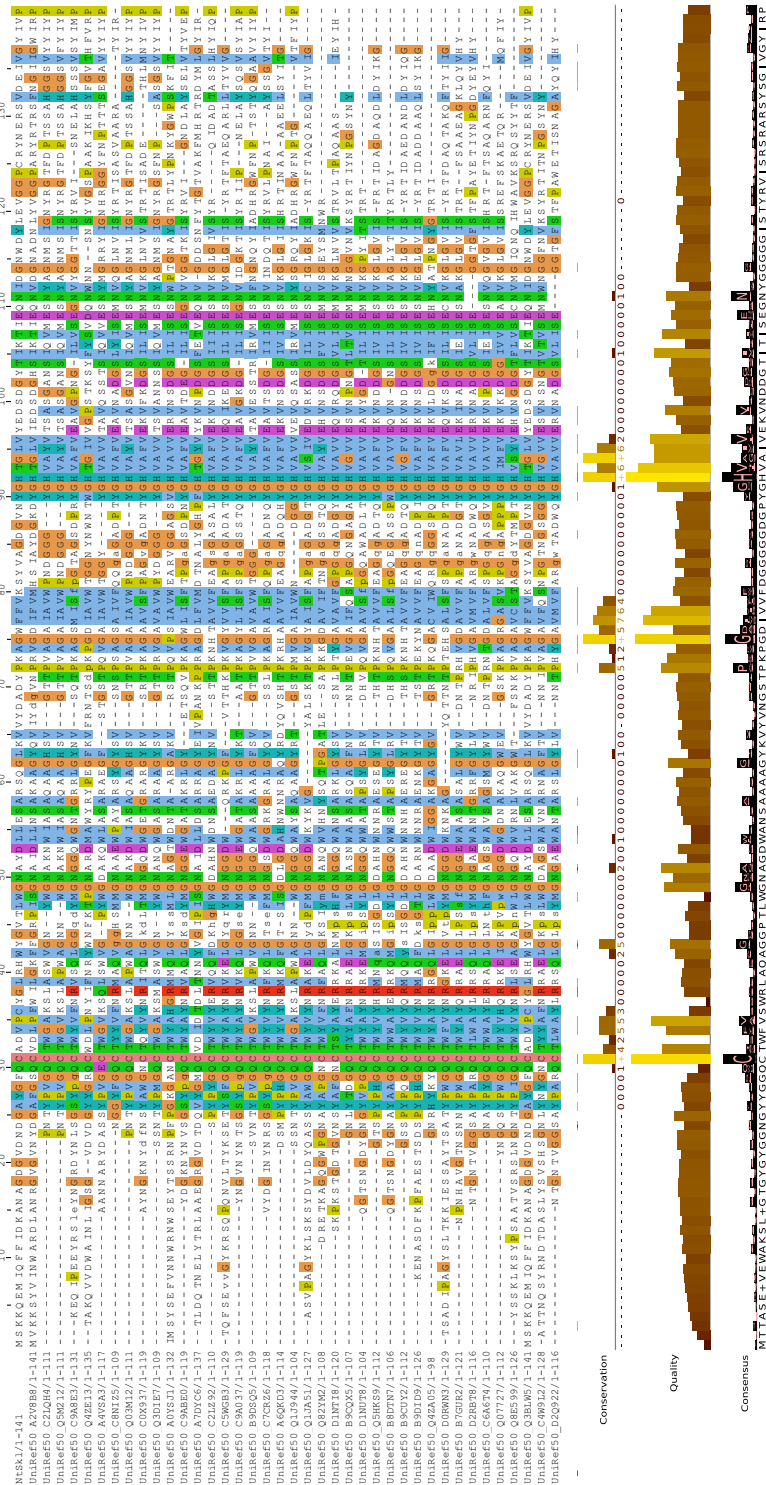


Figura 8.1. Alineamiento de la familia CHAP y secuencia consenso (representación de las 40 primeras secuencias). Coloración según esquema CLUSTAL. Secuencia consenso obtenida con JALVIEW a partir de las secuencias incluidas en el alineamiento de la familia (495 secuencias).

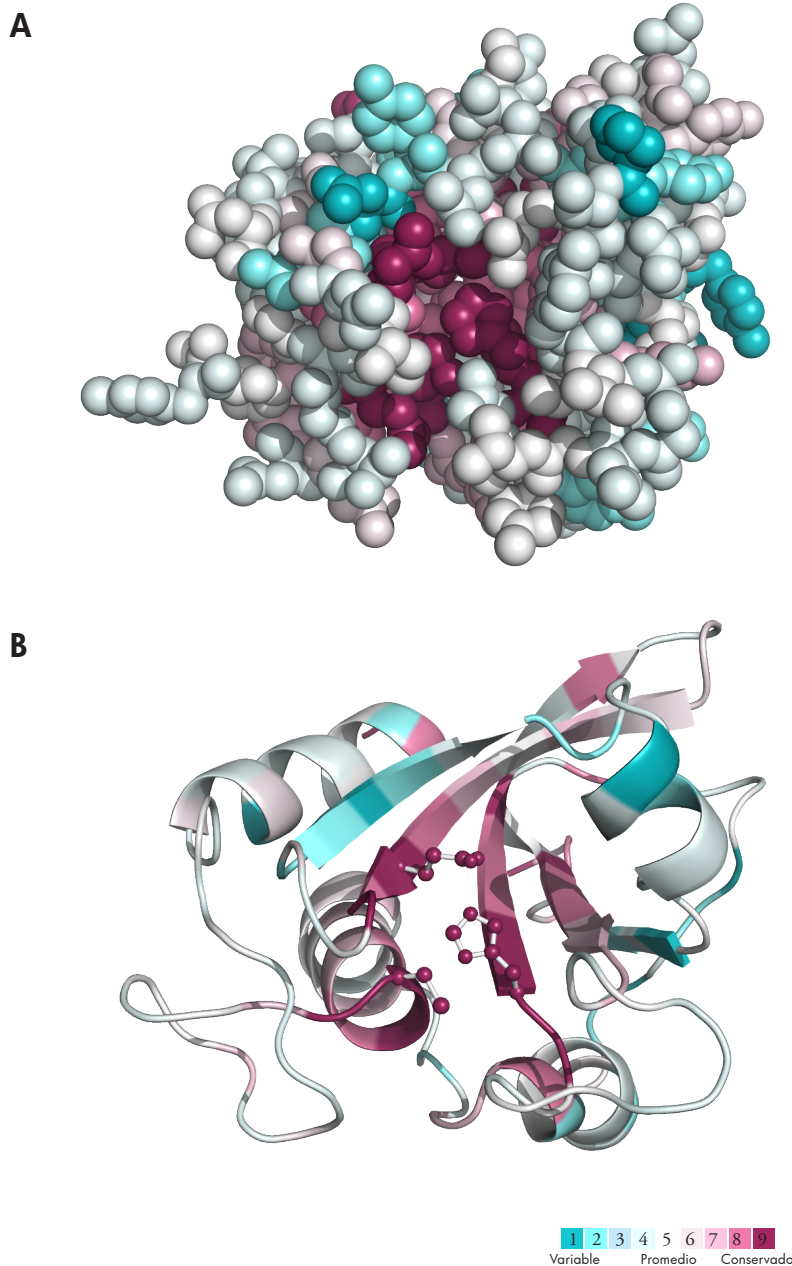


Figura 8.2. Conservación de aminoácidos de la familia CHAP en N-Skl. Modelo de N-Skl coloreado según grado de conservación y representado con la misma orientación en esferas **(A)** y en cintas **(B)**; los aminoácidos propuestos como catalíticos se representan en modelo de esferas y varillas. Clasificación realizada con el programa ConSurf basada en el alineamiento de la familia.

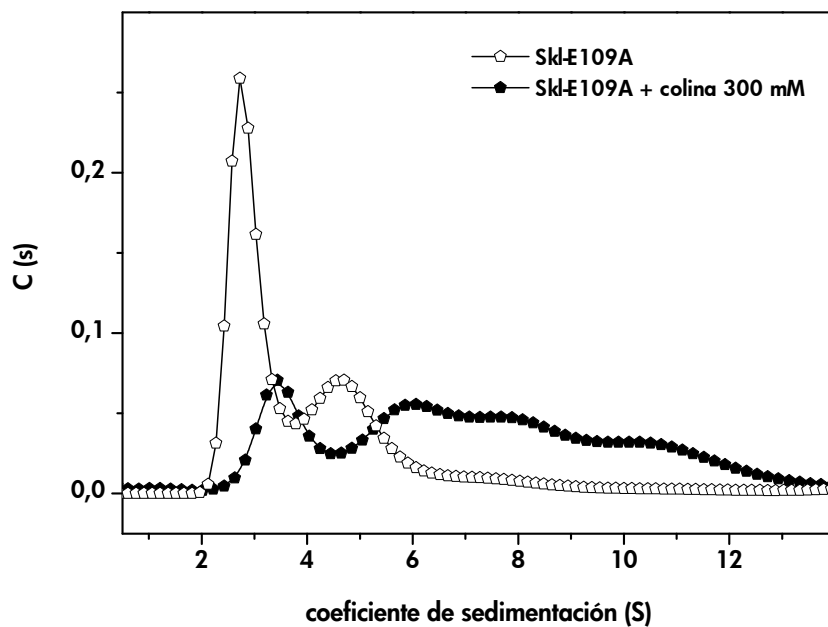


Figura 8.3. Distribución de los coeficientes de sedimentación del mutante de Skl E109A en ausencia y en presencia de colina. Medidas realizadas a 20°C y 45.000 rpm en tampón PB, pH 6,5 (5,5 μ M de proteína).